SÉRIE A, N° 4384
N° D'ORDRE :
5234

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Maryse REYSS-BRION

1re THÈSE. — L'effet des rayons X sur les potentialités respectives de l'ectoderme compétent et de son inducteur naturel chez la jeune Gastrula d'Amphibien.

2e THÈSE. — Propositions données par la Faculté.
La tolérance immunologique acquise pendant la vie embryonnaire.

Soutenues le 18 Mars 1965, devant la Commission d'examen.

MM. GALLIEN *Président.*
HOUILLON, WOLFF } *Examinateurs.*

MASSON ET Cie, ÉDITEURS
LIBRAIRES DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE
120, Boulevard Saint-Germain, PARIS (VIe)
1965

Série A, n° 4384
N° d'ordre :
5234

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Maryse REYSS-BRION

1re THÈSE. — L'effet des rayons X sur les potentialités respectives de l'ectoderme compétent et de son inducteur naturel chez la jeune Gastrula d'Amphibien.

2e THÈSE. — Propositions données par la Faculté.
La tolérance immunologique acquise pendant la vie embryonnaire.

Soutenues le 18 Mars 1965, devant la Commission d'examen.

MM. GALLIEN *Président.*
HOUILLON, WOLFF *Examinateurs.*

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK - LEIDEN

MASSON ET Cie, ÉDITEURS
LIBRAIRES DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE
120, Boulevard Saint-Germain, Paris (VIe)
1965

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

Doyen ..... M. ZAMANSKY.

PROFESSEURS

G. JULIA	T	Analyse supérieure et Algèbre supérieure.
PRENANT	T	Anat. et Histol. comp.
GRASSÉ	T	Evol. des êtres organisés.
PRÉVOST	T	Chimie organique.
WYART	T	Minéralogie et cristall.
TEISSIER	T	Zoologie.
MANGENOT	T	Biologie végét. (Orsay).
AUGER	T	Physique quant. et relat.
MONNIER	T	Physiologie générale.
PIVETEAU	T	Paléontologie.
ROCARD	T	Physique (E. N. S.).
CARTAN	T	Mathématiques (E. N. S.).
LAFFITTE	T	Chimie générale.
FAVARD	T	Géométrie supérieure.
COULOMB	T	Physique du Globe.
Mlle COUSIN	T	Biol. anim. (S. P. C. N.).
CHRÉTIEN	T	Chimie minérale.
DRACH	T	Zoologie.
KASTLER	T	Physique (E. N. S.).
EPHRUSSI	T	Génétique.
RIVIÈRE	T	Géologie (S.P.C.N.) et sédimentologie (Orsay).
GAUTHERET	T	Biologie végét. (P. C. B.).
R. LUCAS	T	Recherches physiques.
A. THOMAS	T	Biologie cellulaire.
ARNULF	T	Optique appliquée.
MORAND	T	Enseig. de physique.
SOLEILLET	T	Physique (P. C. B.).
FORTIER	T	Mécan. expér. des fluides.
PETIT	T	Biologie maritime.
QUENEY	T	Météorologie et dynamique atmosphérique.
GALLIEN	T	Embryologie.
EICHORN	T	Botanique.
DE CUGNAC	T	Biol. végét. (S. P. C. N.).
Mlle CAUCHOIS	T	Chimie physique.
THELLIER	T	Physique du Globe.
L'HÉRITIER	T	Biologie gén. (Orsay).
GRIVET	T	Radio-Electricité (Orsay).
PONCIN	T	Mécanique générale.
DUBREIL	T	Arithmétique et théorie des nombres.
QUELET	T	Chimie organique.
CAGNIARD	T	Géophysique appliquée.
CHAMPETIER	T	Chimie macromolécul.
CUVILLIER	T	Micropaléontologie.
JUNG	T	Géologie.
TRILLAT	T	Microscopie et diffraction électronique.
WIEMANN	T	Chimie org. et structur.
JACQUINOT	T	Spectroscopie et physique céleste (Orsay).
VASSY	T	Physique de l'atmosph.
DESTOUCHES	T	Théories physiques.
AMIEL	T	Chimie générale.
HOCART	T	Minéralogie et cristall.
J.-P. MATHIEU	T	Physique (Optique).
COUTEAUX	T	Cytologie.
MAY	T	Zoologie (Orsay).
CHOQUET	T	Théor. des fonctions et topologie.
FELDMANN	T	Biologie végétale marine.
GUINIER	T	Phys. des solides (Orsay).
JOST	T	Physiologie comparée.
FORTET	T	Calcul des probabilités et physique mathémat.
SCHWARTZ	T	Calc. diff. et intégr.
CHOUARD	T	Physiologie végétale.
MALAVARD	T	Aviat. (Tech. aéronaut.).
BRELOT	T	Calcul différ. et intégr.
NORMANT	T	Synthèse organique.
BENARD	T	Chimie minérale.
BUVAT	T	Botanique (E. N. S.).
DUGUÉ	T	Statistiques mathémat.
SOULAIRAC	T	Psychophysiologie.
ULRICH	T	Physiol. végétale appl.
MARÉCHAL	T	Optique théor. et appl.
KIRRMANN	T	Théories chimiques.
CHADEFAUD	T	Botanique.
Mlle LE BRETON	T	Physiol. de la nutr.
LELONG	T	Applic. de l'analyse à la géométrie.
DEVILLERS	T	Anat. et histol. comp.
EHRESMANN	T	Topologie algébrique.
FRANÇON	T	Physique (S. P. C. N.).
GLANGEAUD	T	Géogr. phys. et géol.
GODEMENT	T	Mathématiques (M. G. P.).
PISOT	T	Techniques mathémat. de la Physique.
ROCH	T	Géologie.
SCHATZMANN	T	Astrophysique.
TERMIER	T	Géologie générale.
ZAMANSKY	T	Mathémat. générales.
LENNUIER	T	Physique (M. G. P.).
RIZET	T	Génétique.
ROUTHIER	T	Géologie appliquée.
Mme TONNELAT	T	Physique théorique.
DIXMIER	T	Mathématiques (M. P. C.).
SOUCHAY	T	Chimie générale.
AIGRAIN	T	Electrotechn. génér.
BRUSSET	T	Chimie systématique.
M. LÉVY	T	Physique théorique des hautes énerg. (Orsay).
Mme CHAIX	T	Chimie biologique.
Mme HUREL-PY	T	Biol. végétale (P. C. B.).
PIAUX	T	Chimie (M. P. C.).
BRUN	T	Mécan. théor. des fluides.
LEDERER	T	Chimie biol. (Orsay).
Mme DUBREIL	T	Mathém. (Agrégation).
Mme LELONG	T	Mathématiques II (E. N. S.) .
BELLAIR	T	Géologie (S. P. C. N.).
COTTE	T	Physique électricité.
J.-E. DUBOIS	T	Chimie organique.
LAMOTTE	T	Zoologie (E. N. S.).
A. MICHEL	T	Chimie minér. (Orsay)
OLMER	T	Energétique générale.
ROUAULT	T	Electricité (Orsay).
GAUTHIER	T	Mécanique appliquée.
BARCHEWITZ	T	Chimie physique.
BROSSEL	T	Physique atomique.
BUSER	T	Physiologie comparée.
CAMUS	T	Phys. végét. (Orsay).
CASTAING	T	Physique II. Thermod. (Orsay).
CURIEN	T	Minéral. et cristallogr.
MOYSE	T	Physiol. végét. (Orsay).
NOIROT	T	Evol. des êtres organisés
PANNETIER	T	Chimie générale.
POSSOMPÈS	T	Zoologie.

Professeurs *(suite)*.

PULLMANN ..... T Chimie quantique.
TEILLAC ..... T Physique nucl. et radio-activité (Orsay).
TONNELAT ..... T Biol. phys.-chim. (Orsay).
VILLE ..... T Econométrie.
WILLEMART ..... T Chimie (P. C. B.).
DODÉ ..... T Chimie (Orsay).
FREYMANN ..... T Recherches physiques.
GUINOCHET ..... T Biologie vég. (S.P.C.N.) (Orsay).
ROLLET ..... T Chimie minérale.
Mlle JOSIEN ..... T Chimie (S. P. C. N.).
CHEVALLEY ..... T Géométr. algébr. et théor. des groupes.
ARNOULT ..... T Electronique (Orsay).
CHAPELLE ..... T Physique I (Orsay).
DELANGE ..... T Mathématiques I (Orsay).
DENY ..... T Mathém. génér. (Orsay).
GERMAIN ..... T Mécan. théor. des fluides.
G. LUCAS ..... T Géologie.
ALLARD ..... T Chimie physique.
BERTHELOT ..... T Phys. des partic. Fond. (Orsay).
BRICARD ..... T Météorol. et physique de l'atmosphère.
Mme ALBE-FESSARD T Psychophysiologie.
FRIEDEL ..... T Physique des solides (Orsay).
M. JULIA ..... T Etudes des moléculaires complexes.
LENDER ..... T Biol. animale (S. P. C. N.) (Orsay).
MAGAT ..... T Physico-chim. des radio-éléments.
Mlle QUINTIN .... T Electrochimie.
MONOD ..... T Chimie du métabolisme.
BENOIT ..... T Physiol. anim. (Orsay).
DE POSSEL ..... T Analyse numérique.
CHARLOT ..... T Chimie analytique.
LÉMÉE ..... T Ecologie vég. (Orsay).
GUÉRIN ..... T Chimie (M. P. C.) (Orsay).
M. CHATELET .... T Chimie (P. C. B.).
JEAN ..... T Phys. nucl. (Orsay).
MATTLER ..... T Physique (S. P. C. N.).
BERGERARD ..... T Zoologie (Orsay).
BERTEIN ..... T Electronique (Orsay).
BOUISSIÈRES ..... T Radiochimie.
Mme COUTURE ... T Thermodynamique et méc. physique.
ELLENBERGER .... T Géol. des grandes régions du globe.
FRANC ..... T Biol. animale (P. C. B.).
SCHNELL ..... Botanique tropicale.
STOLKOWSKI ..... T Physiologie végétale.
ACHER ..... T Chimie biologique.
BAUDOIN ..... Biol. anim. (P. C. B.).
BEAUMONT ..... Biol. anim. (S. P. C. N.).
BLAMONT ..... T Géophys., Ionosphère.
BOURREAU ..... T Botanique.
D. CURIE ..... Physique (M. G. P.).
DURAND-DELGA ... T Géologie.
FRÉON ..... T Chimie organ. (Orsay).
HELLER ..... T Physiologie végétale.
TORTRAT ..... T Calcul des probabilités.
CAILLEUX ..... T Géologie (S. P. C. N.).
MAGNAN ..... T Physique (S. P. C. N.).
DAUDEL ..... T Mécan. ondul. appl. à la chimie théor. et à la phys. nucl.
Mlle FOURCROY ... Biol. végét. (S. P. C. N.).
Mme CHOQUET-BRUHAT ..... T Méc. analytique et mécan. céleste.
Mlle VEIL ..... T Physiologie générale.
LWOFF ..... T Microbiologie.
SIESTRUNCK ..... T Mécan. phys. et expér.
LACOMBE ..... T Métal. des métaux Nucl. (Orsay).
BROCHARD ..... T Physique P.C.B. (Orsay).

CABANNES ..... T Mécanique générale.
LESIEUR ..... T Mathématiques I (Orsay).
MAZET ..... T Mécan. génér. (Orsay).
CAIRE ..... Géographie physique et Géol. dynamique.
COMOLET ..... T Mécanique des fluides.
CORABOEUF ..... T Physiol. anim. (Orsay).
DELLOUE ..... Physique de l'exosphère.
GORENFLOT ..... Botanique II (Orsay).
HOUILLON ..... Biol. anim. (P. C. B.).
JULLIEN J. ..... Chimie (S.P.C.N.) (Orsay).
MALGRANGE ..... T Tech. math. de la phys. (Orsay).
OLIVIER ..... Anthropologie.
NOZERAN ..... T Botanique II (Orsay).
BLANC-LAPIERRE . T Phys. (E. N. S.) (Orsay).
CHEVAUGEON .... T Botanique (Orsay).
KAHANE ..... T Mathématiques (Orsay).
SAMUEL ..... T Mathém. (E.N.S. fémin.).
KOURGANOFF .... T Astronomie (Orsay).
THIRY ..... T Mécanique céleste.
ABELES ..... Physique (S. P. C. N.).
AMAT ..... T Physique (P. C. B.).
AUBOIN ..... T Géologie.
Mme BENOIT-GUEUTAL ..... T Phys. nucl. et radio-act. (Orsay).
BOUGIS ..... Biologie marine (Villefranche-sur-mer).
BRUHAT ..... T Mathématiques (M. P. C.).
BRUNN ..... T Géol. histor. (Orsay).
CHABBAL ..... T Phys. (M. G. P.) (Orsay).
DEHEUVELS ..... T Mathématique Propé.
D'ESPAGNAT ..... T Physique théor. (Orsay).
FURON ..... T Géologie (S. P. C. N.).
Mme GANS ..... T Génétique.
GENÈVES ..... Biologie végét. (P. C. B.).
GUILBERT ..... Phys. (C. U. S. Orléans).
HUPE ..... T Pétrographie.
HOLLANDE ..... T Biologie générale.
LIONS ..... T Analyse numérique.
MAITTE ..... T Chimie (P. C. B.).
MEYER ..... Physique propédeutique.
NICOLAS ..... Géologie appliquée.
PANIGEL ..... Biologie générale.
RAVIER ..... Pétrographie.
ROSEAU ..... T Mécan. théor. des fluides.
ROUBINE ..... T Electronique.
SILBER ..... T Chimie P. C. B.
UEBERSFELD ..... T Electronique.
YVON ..... T Théories physiques.
HERVÉ ..... T Mathématiques.
NÉRON ..... T Math. (M. P. C.) (Orsay).
Mme PECKER-WIMEL ..... T Astrophysique.
BALKANSKY ..... Physique (M. P. C.).
LE CORRE ..... T Electricité.
DELCROIX ..... T Phys. théorique (Orsay).
GOURDIN ..... Phys. théor. des Hautes-Énergies (Orsay).
LEHMANN ..... T Phys. exp. des Hautes-Énergies (Orsay).
NATAF ..... T Phys. nucl. et radio-activité (Orsay).
ECHALIER ..... Biol. anim. (P. C. B.)
BARRAUD ..... Physiologie cellulaire.
LIORET ..... Physiol. végétale (Orsay).
DARS ..... Géol. struc. et Géol. appl.
CAMEFORT ..... T Botanique (agrégation).
VICHNIEWSKY .... T Mécanique industrielle.
BLAQUIÈRE ..... Electronique (Orsay).
ARNOUS ..... T Physique théorique.
TATIBOUET ..... Chimie (C.S.U. Orléans).
MALLIAVIN ..... T Math. propéd. (Orsay).
GAUDEMAR ..... Chimie propéd.
PEREZ Y JORBA ... Phys. exp. des Hautes-énergies (Orsay).
DAVID ..... T Chimie (Agrég. Orsay).
BROUSSE ..... T Mécanique théorique.

Secrétaire général ..... R. POULLAIN.

ARCHIVES D'ANATOMIE MICROSCOPIQUE
ET DE MORPHOLOGIE EXPÉRIMENTALE
Tome **53**. — *N° 4* SUPPLÉMENT *1964*

L'EFFET DES RAYONS X SUR LES POTENTIALITÉS RESPECTIVES DE L'ECTODERME COMPÉTENT ET DE SON INDUCTEUR NATUREL CHEZ LA JEUNE GASTRULA D'AMPHIBIEN

Par M^me^ M. REYSS-BRION

(*Institut d'Embryologie expérimentale du C. N. R. S.,*
Laboratoire du Collège de France, Directeur : ET. WOLFF
49 *bis*, avenue de la Belle-Gabrielle, Nogent, Seine.)

SOMMAIRE

INTRODUCTION 399

MATÉRIEL ET TECHNIQUES 400

I. — IRRADIATIONS TOTALES ET LOCALISÉES AUX RAYONS X DE L'ŒUF DE BATRACIEN

1° *Essais de destruction sélective de l'ébauche nerveuse, après des irradiations totales de l'embryon* 402

2° *Irradiations séparées des territoires inducteurs et réacteurs de la jeune gastrula de Pleurodèle* 406

a) Irradiation de la calotte ectodermique 407

b) Irradiation du territoire chordo-mésodermique 410

II. — ETUDE DE LA PERTE DE COMPÉTENCE DE L'ECTODERME A DONNER DES STRUCTURES NERVEUSES, APRÈS IRRADIATION AUX RAYONS X

1° *Introduction et historique* 412

2° *Irradiations de l'ectoderme de jeune gastrula à des doses de rayons X progressivement décroissantes* 415

a) Irradiations de la calotte ectodermique 417

b) Irradiations totales de jeunes gastrulas 429

3° *Association en parabiose d'animaux irradiés avec des animaux sains* .. 432

4° *Résumé* 438

III. — Etude des potentialités du territoire inducteur chordo-mésodermique, après irradiation aux rayons X

1° *Introduction et historique* 438

2° *Greffes de lèvres blastoporales dorsales, irradiées ou normales, dans un fragment d'ectoderme sain* 440

a) Culture d'ectoderme présomptif isolé 441

b) Greffe de lèvre blastoporale dorsale normale dans un ectoderme normal 441

c) Greffe d'une lèvre blastoporale irradiée à 1 170 r, dans un ectoderme sain 445

d) Greffe d'une lèvre blastoporale irradiée à 30 000 r, dans un ectoderme sain 445

e) Greffe d'une lèvre blastoporale dorsale irradiée à 150 000 r, dans un ectoderme sain 447

3° *Expériences complémentaires* 452

a) Culture de lèvres blastoporales dorsales irradiées 452

b) Greffes de lèvres blastoporales irradiées de Pleurodèles dans de jeunes gastrulas de Discoglosses 455

c) Implantation de fragments d'ectoderme irradié dans un ectoderme sain 456

IV. — Discussion et conclusions

Résumé 459

INTRODUCTION

R. Rugh (1954) a montré que les rayons X, administrés à l'œuf d'un Batracien anoure : *Rana catesbiana,* au stade blastula produisent des embryons dont le système nerveux est réduit ou même absent.

H. Lutz, Ch. Bonhomme et Y. Lutz-Ostertag (1955 *a* et *b*), utilisant les ultrasons, obtiennent des résultats comparables avec le blastoderme d'oiseau.

Dans les expériences de ces auteurs, les radiations sont appliquées à un stade où le système nerveux n'a pas encore acquis sa détermination. Elles agissent donc sur un ectoderme encore indifférent. Il nous a semblé intéressant de chercher à reproduire ces résultats et tenter de les expliquer par l'analyse expérimentale.

On sait que la différenciation de la plaque neurale est due à une action inductrice du toit archentérique sur l'ectoderme sus-jacent. Deux hypothèses sont donc à envisager : s'agit-il d'une lésion spécifique de l'ectoderme qui empêche sa différenciation en système nerveux ? ou bien l'agent perturbateur agit-il d'une manière médiate en affaiblissant l'inducteur chordo-mésodermique ?

La première partie du travail est dès lors tracée et comporte deux étapes :

1° Essais de destruction sélective de l'ébauche nerveuse.

2° Irradiations du territoire compétent ectodermique d'une part, et de l'inducteur chordo-mésodermique d'autre part.

Dans une deuxième partie, nous nous sommes attachée à l'étude de la perte de compétence de l'ectoderme traité par les rayons X. Est-ce une disparition brusque ou au contraire progressive ? Dans ce dernier cas, est-elle sélective et quelles sont les structures qui disparaissent les premières ? La solution de ce problème réside principalement dans l'étude détaillée des structures obtenues après des irradiations de plus en plus modérées de l'ectoderme.

Enfin, il restait à étudier les potentialités de l'inducteur. Aux doses de rayons X utilisées, s'il n'y a pas suppression du pouvoir inducteur, peut-on mettre en évidence un changement dans la régionalité des inductions obtenues ? En dernier lieu, il reste à vérifier si le pouvoir inducteur de la lèvre blastoporale dorsale persiste après des irradiations de très forte intensité et à comparer ces résultats avec ceux obtenus jusqu'alors par d'autres auteurs.

Les recherches exposées dans ce travail ont été poursuivies dans le laboratoire d'Embryologie expérimentale, d'abord au Collège de France, ensuite à Nogent-sur-Marne, sous la direction de mon maître M. le Professeur Etienne Wolff. Je suis heureuse de lui exprimer ici ma profonde gratitude pour le choix

de ce sujet et pour l'intérêt qu'il m'a témoigné au cours de ces recherches. Son enseignement, les conseils et encouragements qu'il m'a toujours dispensés m'ont été un grand soutien. Je le remercie également pour les grandes facilités de travail que j'ai toujours trouvées dans son laboratoire.

Qu'il me soit également permis d'exprimer ma reconnaissance à M. le Professeur L. GALLIEN et ses collaborateurs, en particulier M. le Professeur CH. HOUILLON, qui m'ont initiée à l'Embryologie des Batraciens et auprès desquels j'ai toujours trouvé aide et compréhension.

Je ne saurais oublier toutes les personnes qui m'ont apporté leur aide au cours de ce travail, en particulier M. B. HENRY et M^me PARIS, qui ont contribué à l'illustration de ce mémoire.

Je remercie vivement M. le Professeur L. GALLIEN qui a bien voulu s'intéresser à mon travail et me faire l'honneur d'accepter la présidence du jury de ma thèse.

MATÉRIEL ET TECHNIQUES

A. — ESPÈCES UTILISÉES

Nos recherches ont été faites sur deux Urodèles = le Triton *Pleurodeles Waltlii* Michah, et sur l'Axolotl *Ambystoma mexicanum* Shaw. Nous avons également opéré sur un Amphibien anoure : *Discoglossus pictus* Otth, dont les œufs, fortement pigmentés, ont été utilisés pour réaliser des greffes hétéroplastiques.

Les Pleurodèles ont été élevés à partir de couples provenant du laboratoire de M. le Professeur L. GALLIEN et les Discoglosses nous ont été expédiés directement de Tunisie. Les Axolotls ont été fournis par divers élevages de la région parisienne.

Pour la détermination des stades, on a utilisé les tables chronologiques établies par GALLIEN et DUROCHER (1957) pour le Pleurodèle, par GALLIEN et HOUILLON (1951) pour le Discoglosse et HARRISON (1) pour l'Axolotl.

B. — TECHNIQUES.

1° *Techniques d'élevage des animaux*, d'obtention et de conservation des pontes.

Elles m'ont été, ainsi que certaines techniques opératoires, enseignées par M. le Professeur L. GALLIEN et ses collaborateurs et ont fait l'objet de publications dans leur laboratoire (L. GALLIEN, 1948-1952).

Je ne les rappellerai que brièvement ici.

Les pontes ont été obtenues, chaque fois que c'était possible, à la suite d'accouplements spontanés. Dans quelques cas, nous avons cependant eu recours, pour les Pleurodèles, à des injections d'hormones gonadotropes : 50 U. I. d'hormones gonadotropes d'urine de femme enceinte (Ciba) dissoutes dans 1/10 cm³ d'eau filtrée; ou 20 U. Février de gonadotropine hypophysaire Choay. C'est la deuxième méthode qui est la plus efficace.

(1) Dans HAMBURGER (V.) : A manual of experimental Embryology, p. 202, 203, 204.

En ce qui concerne les Axolotls, il suffit de les maintenir 24 heures à basse température (5° C) et de les remettre à la température de l'aquarium (18° C environ). La ponte survient généralement 2 ou 3 jours après.

Les Discoglosses, par contre, doivent être placés dans un aquarium dont on chauffe l'eau jusqu'à la température de 25° C. Un thermostat permet de maintenir cette température constante jusqu'à l'obtention de la ponte.

Dans tous les cas, les œufs sont conservés à la température de l'aquarium (15-18° C) ou entreposés dans un réfrigérateur dont on règle la température à 8° C si l'on désire ralentir le développement embryonnaire, de façon à pouvoir opérer plusieurs jours de suite sur une même ponte.

2° *Techniques d'irradiation aux rayons X.* — L'appareil utilisé est un tube Picker PX 2A, à anticathode de tungstène de 3,8 mm². L'œuf est placé à 11 cm de l'anticathode et l'appareil fonctionne sous 60 kV, 8 mA, sans filtre. En conservant ces données constantes, on peut établir une équivalence entre la durée de l'irradiation et l'intensité du rayonnement. La dose à feu nu est donnée en rœntgens par mn en fonction de la distance (x) par la relation $= Dr/m = \frac{1{,}2 \cdot 10^3}{x^2 \text{ cm}}$, soit 1 000 r/m à 11 cm.

On se reportera aux différents chapitres pour voir les détails de technique qui varient suivant les expériences.

3° *Techniques opératoires.* — Elles sont de trois sortes : greffes, cultures *in vitro* et parabioses. Les détails correspondant à chacune seront donnés dans les comptes rendus d'expériences.

Les instruments utilisés sont les intruments classiques de l'Embryologie expérimentale : pinces d'horloger (pinces Brucelles n° 5) pour le dégangage et de déchorionnage des œufs, bistouris et boucles en fil de platine à section de 3 et 4/100 de mm pour le découpage des territoires à transplanter.

Le transport des explants ou des œufs se fait dans des pipettes courbes bien rodées et les différentes manipulations se font avec les précautions d'asepsie habituelles.

Les coupelles opératoires sont des boîtes de Pétri avec couvercle de 70 mm de diamètre et 23 mm de hauteur.

On recouvre le fond d'agar-agar (solution à 12 p. 1 000 dans du liquide de Holtfreter) dans lequel on peut creuser des logettes pour les œufs à l'aide d'une pipette terminée par une boule de la taille de l'œuf et chauffée.

Les mêmes coupelles sont utilisées pour l'élevage. Lorsqu'il s'agit d'explants ou d'embryons mal cicatrisés, le fond des coupelles est recouvert d'une mince couche de gélose qui permet d'éviter une adhérence des cellules au verre.

Après dégangage, à la pince, sur fond de pâte à modeler, les embryons sont lavés dans 2 ou 3 bains de liquide de Holtfreter stérile, dilué au 1/10 avec de l'eau distillée stérile afin d'éviter des exogastrulations. Toutes les opérations sont faites dans le liquide physiologique de Holtfreter (solution standard) stérilisé et additionné d'un sulfamide : l'Elkosine Ciba, à raison d'une ampoule de 5 ml par litre de solution. Dans nos expériences récentes, nous avons utilisé du liquide de Holtfreter sans bicarbonate de sodium.

Après les opérations, les embryons sont replacés dans la solution de Holtfreter diluée au 1/10 et appelée solution d'élevage. Ils sont remis dans l'eau ordinaire après complète cicatrisation.

Les explants sont cultivés dans la solution standard de Holtfreter.

4° *Techniques histologiques.* — Les œufs et les jeunes larves sont fixés au Zenker acétique. Nous avons utilisé la méthode d'inclusion à la celloïdine-

paraffine de Peterfi (1921) et employé de la paraffine à 48° afin d'éviter un durcissement du vitellus qui provoquerait le déchirement et le décollage des coupes.

Les coupes, d'une épaisseur de 10 μ, sont colorées dans quelques cas à l'hémalun-éosine, mais plus fréquemment suivant la technique de Damas (1945) qui permet une bonne identification des structures dans le cas des tissus chargés de vitellus.

I. — *IRRADIATIONS TOTALES ET LOCALISÉES, AUX RAYONS X, DE L'ŒUF DE BATRACIEN*

1° Essais de destruction sélective de l'ébauche nerveuse après des irradiations totales de l'embryon

Matériel et méthodes

Les expériences sont toutes faites sur le Pleurodèle. Dans les séries préliminaires où nous désirions irradier plusieurs œufs à la fois, nous avons placé ceux-ci, après un dégangage partiel, dans une petite chambre de culture de

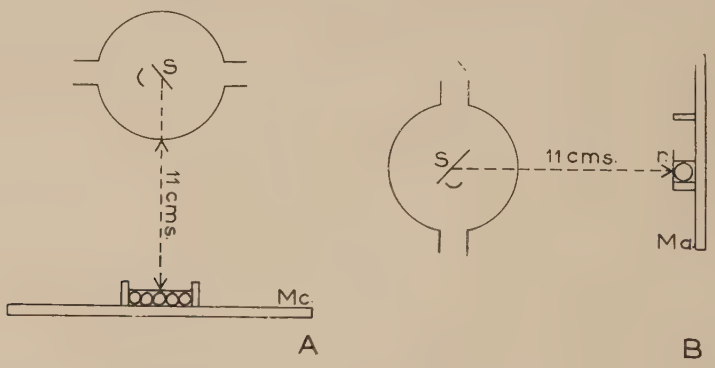

Fig. 1. — Dispositif simple d'irradiation totale et localisée.

A. Irradiation totale et verticale d'un lot d'œufs. Les œufs sont placés dans un microcristallisoir *(Mc.)*. Le rayonnement les traverse dans le sens pôle animal - pôle végétal.

B. Irradiation latérale, totale ou localisée, d'œufs isolés. L'œuf est disposé dans un microaquarium *(Ma.)* réalisé en obturant partiellement la face supérieure du microcristallisoir *(Mc.)* par une lamelle de rhodoïd *(r)*, en forme de demi-cercle. Celui-ci est maintenu redressé et l'œuf est irradié latéralement.

15 mm de diamètre, collée sur une lame d'histologie et fonctionnant comme un micro-cristallisoir. On laisse le moins d'eau possible au-dessus des œufs afin d'éviter une absorption trop importante du rayonnement et on amène ceux-ci sous l'appareil à rayons X, à 11 cm de l'anticathode. Les œufs sont traversés par un rayonnement vertical dirigé dans le sens pôle animal - pôle végétatif. On

peut irradier de cette façon des lots de 15 ou 20 œufs (fig. 1, *A*). Etant donné le petit diamètre de la chambre de culture, on peut considérer qu'ils ont tous reçu la même dose de radiations (mesure J. M. Kirrmann, 1962).

Dans les expériences ultérieures, l'œuf a été complètement dégangué et irradié latéralement; ceci afin de permettre une comparaison avec les résultats des expériences d'irradiations localisées qui se font obligatoirement dans le sens horizontal.

L'œuf est alors placé dans un micro-aquarium réalisé en obturant partiellement l'ouverture de la chambre de culture utilisée précédemment, à l'aide d'une lamelle de rhodoïd très mince en forme de demi-cercle.

Nous avons vérifié (1) que l'absorption des rayons X par cette lamelle peut être considérée comme négligeable.

On utilise un faisceau de rayons X horizontal et on lui présente l'œuf de profil en redressant verticalement le microaquarium. Les rayons traversent donc l'œuf latéralement. (fig. 1 *B*).

Résultats expérimentaux

Dans une série d'essais préliminaires, nous avons irradié plusieurs lots, chacun d'une cinquantaine d'œufs, au stade blastula (st. 5-6 de Gallien et Durocher) et jeune gastrula (st. 8 *a* et *b*). Nous avons comparé l'effet de différentes doses de rayons X.

Pour des doses supérieures à 1 170 r (1 500, 1 800, 2 100 et 2 600 r), l'embryon se nécrose dans un délai de 2 à 4 jours après l'irradiation. Au stade blastula, la pigmentation perd son homogénéité et les blastomères sont irréguliers. L'aspect général de l'œuf est très altéré. La gastrulation se fait mal et il y a un fort pourcentage d'exogastrulas. Beaucoup de cellules nécrosées sont expulsées et stagnent entre le chorion et l'œuf. La nécrose complète de l'embryon survient sans qu'on puisse déceler l'apparition d'une plaque nerveuse. Lorsqu'on diminue l'intensité du rayonnement (1 000, 800 r), l'embryon évolue de façon plus normale et au stade neurula se dessine un sillon très aminci correspondant à une tentative de différenciation de plaque neurale.

Pour une dose de 1 170 r (1 mn 10 sec. d'irradiation), la gastrulation semble s'effectuer normalement dans la plupart des cas, mais au stade neurula aucune ébauche nerveuse ne semble se différencier. L'embryon évolue cependant pendant quelques jours et s'étire parfois dans le sens céphalo-caudal, sans que rien, à part le neuropore, permette d'identifier une tête ou une queue. Nous avons donc fait des expériences additionnelles avec cette dose de rayons X qui nous semblait apporter les résultats souhaités, et en opérant au stade jeune gastrula (st. 8 *a* et *b*). Les résultats obtenus au stade blastula sont en effet beaucoup moins nets et moins constants et la mortalité est plus importante, ce qu'avait déjà observé Rugh (1954). Nous avons irradié isolément, et avec un faisceau horizontal

(1) Par des mesures faites à l'aide d'une microchambre d'ionisation et d'un électromètre « Dosix » de la C. G. R.

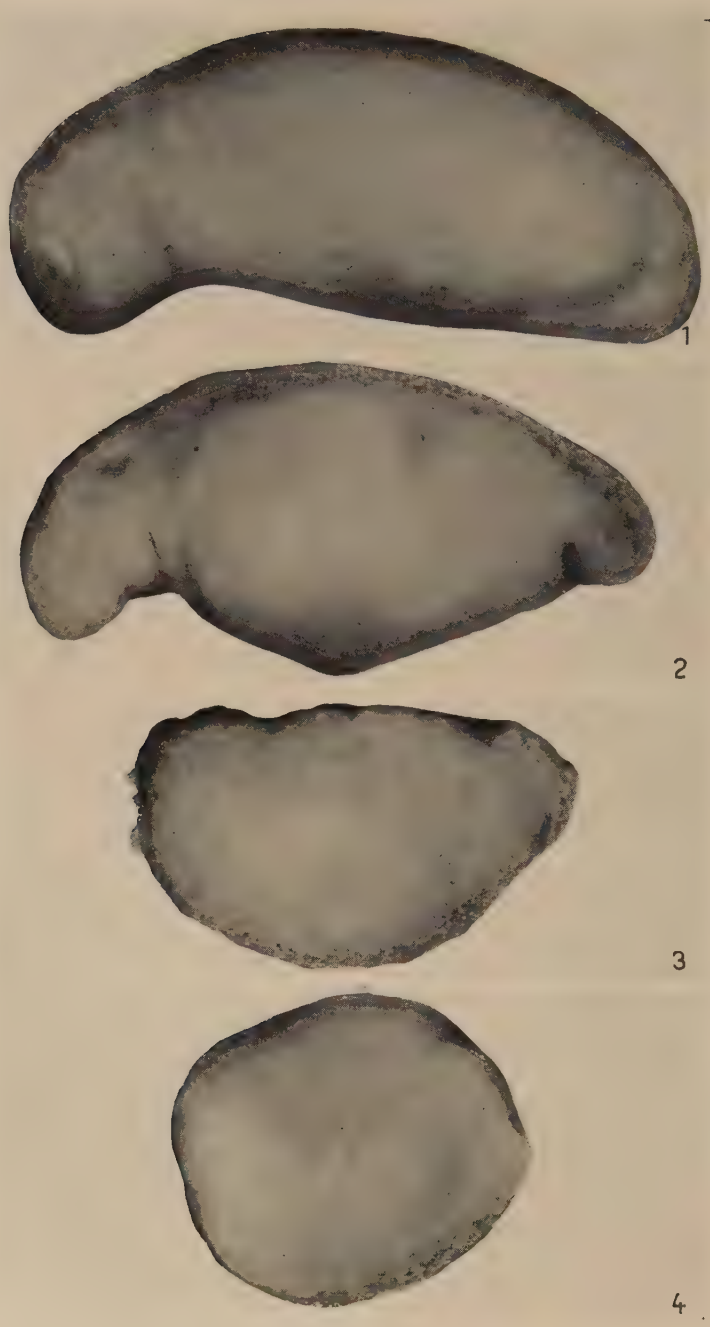

FIG. 2.

de rayons X, 165 embryons. 47 sont morts au cours de la gastrulation. Nous avons fixé les 118 survivants (71 %) 3 et 4 jours après l'irradiation. Ils ont l'aspect arrondi ou étiré en forme d'olive décrit plus haut (fig. 2, cliché 4), sans trace extérieure de plaque nerveuse. Parfois, un léger sillon d'une pigmentation plus sombre en indique cependant l'emplacement.

Ces embryons ont tous été soumis à l'examen histologique. 32 ont été encore éliminés, car leurs tissus présentaient des signes de nécrose trop

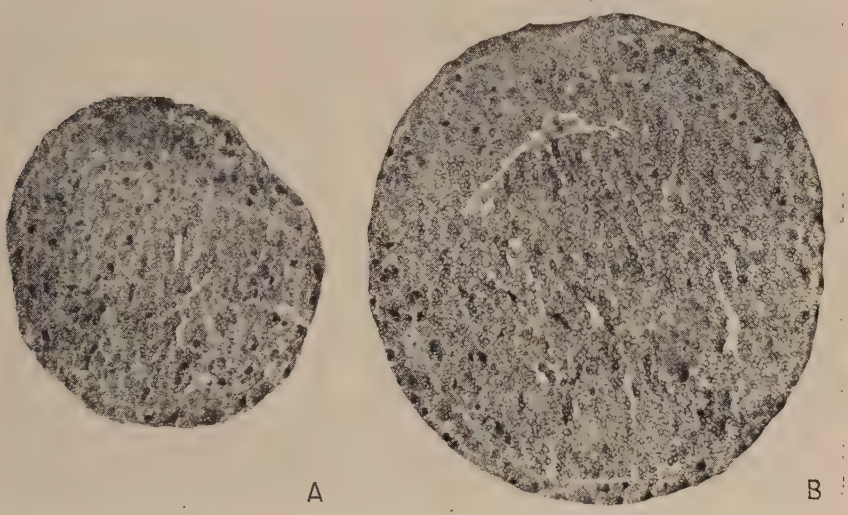

Fig. 3. — Embryon qui a reçu 1 170 r *in toto* (4 jours après l'irradiation) : aucune différenciation nerveuse, chordale ou somitique.

A. Coupe transversale au niveau de la tête.
B. Coupe transversale au niveau du tronc.

(Gr. : × 60.)

avancée pour permettre une bonne identification. Sur les 86 restants, 82 sont totalement dépourvus de système nerveux (95 %) et 4 possèdent quelques cellules d'aspect neuroïde mais non organisées en tube ner-

---

Légende de la figure 2.

1. — Embryon de Pleurodèle, normal, âgé d'environ 4 jours.
2. — Embryon du même âge, ayant reçu, au stade gastrula, une irradiation de 1 170 r, localisée au pôle inférieur de l'œuf.
3. — Embryon du même âge, ayant reçu, au stade gastrula, une irradiation de 1 170 r, localisée à la calotte ectodermique.
4. — Embryon du même âge, irradié *in toto*, au stade jeune gastrula (1 170 r).

(Gr. : × 32.)

veux (5 %). La chorde est absente dans 76 cas (88 %) et les somites dans 82 cas (95 %). Ces résultats sont condensés dans le tableau I. L'embryon qui figure sur les clichés 1 et 2 de la figure 3 peut être considéré comme représentatif de cette série. Il ne présente aucune trace de différenciation nerveuse, seul l'épiderme, très mince, est présent.

En résumé

Une irradiation aux rayons X de 1 170 r, appliquée au stade gastrula, provoque donc la suppression totale du système nerveux dans 95 % des cas. Ce résultat acquis, il reste à déterminer sur quelle ébauche agissent les rayons X.

2° Irradiations séparées des territoires inducteurs et réacteurs de la jeune gastrula de Pleurodèle

Méthodes

Nous avons mis au point un dispositif d'écran de plomb percé d'une fenêtre et coulissant le long de la paroi de rhodoïd du microaquarium utilisé précédemment pour des irradiations horizontales. Celui-ci permet de protéger l'un ou l'autre des pôles de l'œuf (fig. 4).

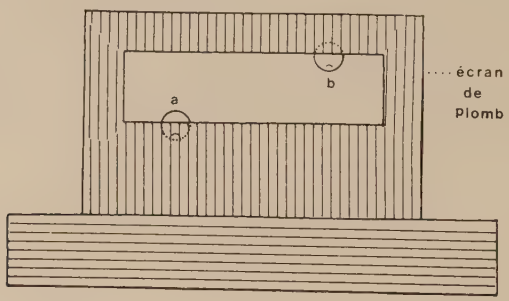

Fig. 4. — Schéma du dispositif d'écran de plomb permettant l'irradiation localisée d'un des pôles de l'œuf.

La carte des ébauches présomptives du Pleurodèle étant très semblable à celle de l'Axolotl (J. Pasteels, 1942), nous avons utilisé celle-ci afin de déterminer l'étendue du territoire qu'il convenait d'irradier.

Dans un cas, nous avons irradié le tiers supérieur de l'œuf et dans l'autre les deux tiers inférieurs. Dans le premier cas, la plus grande partie de la calotte ectodermique est irradiée et on n'empiète que très peu, ou pas, sur le territoire chordo-mésodermique. Dans le deuxième cas, toute l'ébauche chordo-mésodermique est atteinte et le territoire neural présomptif non atteint reste suffisamment étendu pour que l'on ait une réponse valable (fig. 5). La durée de l'irradiation est de 1 mn 10 sec. (1 170 r) comme dans les expériences précédentes.

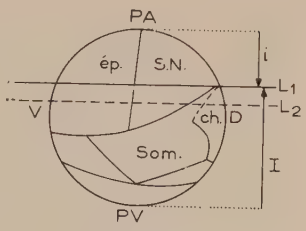

Fig. 5.

Schéma des irradiations locales de la gastrula du Pleurodèle. La ligne L_1 correspond à la limite supérieure ou inférieure de l'irradiation; la ligne L_2 indique la marge d'erreur possible par rapport à L_1. *V*, *D*, face ventrale et dorsale.

i, irradiation de la calotte animale; *I*, irradiation de la région marginale et végétative; *ch.*, ébauche chordale; *ép.*, ébauche épidermique; *som.*, ébauche des somites; *S. N.*, ébauche nerveuse.

Résultats expérimentaux

a) *Irradiation de la calotte ectodermique.* — Nous avons irradié la calotte animale de 107 embryons. 81 ont survécu 3 et 4 jours à l'irradiation (75 %). Leur aspect morphologique est très semblable à celui des

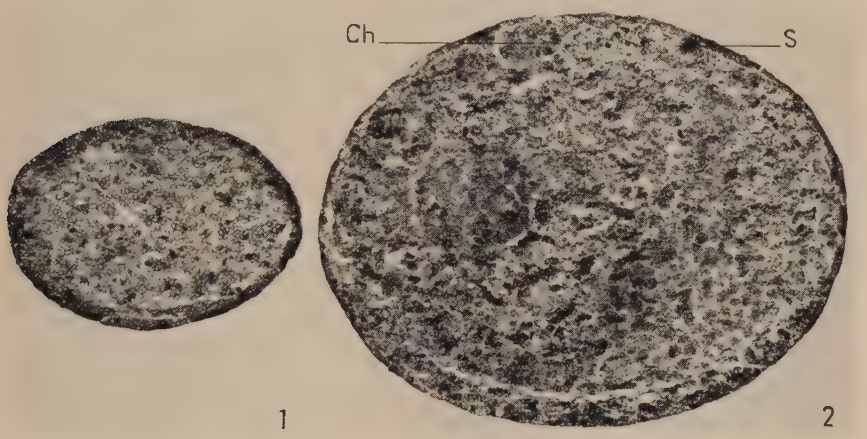

Fig. 6. — Embryon dont le pôle supérieur a été irradié à 1 170 r (4 jours après l'irradiation).

1. — Coupe transversale au niveau de la tête : aucune différenciation nerveuse.

2. — Coupe transversale au niveau du tronc : pas de moelle. On distingue une chorde *(Ch.)* et de minces bandelettes somitiques *(S.)*.

(Gr. : × 53.)

embryons irradiés *in toto :* certains restent arrondis, d'autres, en plus grand nombre, prennent une forme ovoïde très accentuée. Il n'y a aucune trace de plaque nerveuse au stade neurula, juste un léger sillon pigmenté dans quelques cas (fig. 2, cliché 3). 67 de ces embryons ont été soumis à un examen histologique : 25 sont éliminés pour cause de nécrose trop

TABLEAU I

RÉSULTATS HISTOLOGIQUES D'IRRADIATIONS DE JEUNES GASTRULAS DE PLEURODÈLE (1 170 r)

	Irradiations totales de l'œuf (86 embryons)						Irradiations de l'ectoderme (42 embryons)						Irradiations du chordomesoderme (91 embryons)					
	Présent		Atypique		Absent		Présent		Atypique		Absent		Présent		Atypique		Absent	
	Nb	%	Nb	%	Nb	%	Nb	%	Nb	%	Nb	%	Nb	%	Nb	%	Nb	%
Système nerveux.	0	0	4	5	82	95	6	14	8	19	28	67	91	100	0	0	0	0
Chorde.	10	12	0	0	76	88	33	79	3	7	6	14	44	48	14	15	33	37
Somites.	3	3	1	2	82	95	35	83	2	5	5	12	28	31	17	19	46	50

avancée des tissus. Sur les 42 embryons restants, 28 sont totalement dépourvus de système nerveux (67 %), 8 possèdent quelques cellules neuroïdes non organisées (19 %) et 6 ont des formations nerveuses rudimentaires et uniquement spino-caudales (14 %), 33 ont une chorde (79 %) et 35 des somites nettement identifiables (83 %). Voir figure 6, clichés 1 et 2, et tableau I.

On constate donc qu'une irradiation de 1 170 r du territoire ectodermique supprime sa compétence à donner du tissu nerveux dans 86 % des cas. Dans les quelques cas où des différenciations nerveuses apparaissent, elles concernent uniquement la région tronco-caudale de l'embryon. On ne trouve jamais de formations cérébrales. Ceci peut

LÉGENDE DE LA FIGURE 7.

1. — Embryon témoin, stade 22 de GALLIEN et DUROCHER.

a) Coupe transversale au niveau de la tête et des vésicules optiques *(V. O.)*.

b) Coupe transversale au niveau du tronc : moelle *(M.)*, chorde *(Ch.)*, somites *(S.)*.

2. — Embryon dont le pôle inférieur a été irradié à 1 170 r (4 jours après l'irradiation).

a) Coupe transversale au niveau du diencéphale. Les vésicules optiques *(V. O.)* sont encore reliées au cerveau.

b) Coupe transversale au niveau du tronc. La moelle est présente *(M.)* mais les somites et la chorde sont supprimés.

(Gr. : × 80.)

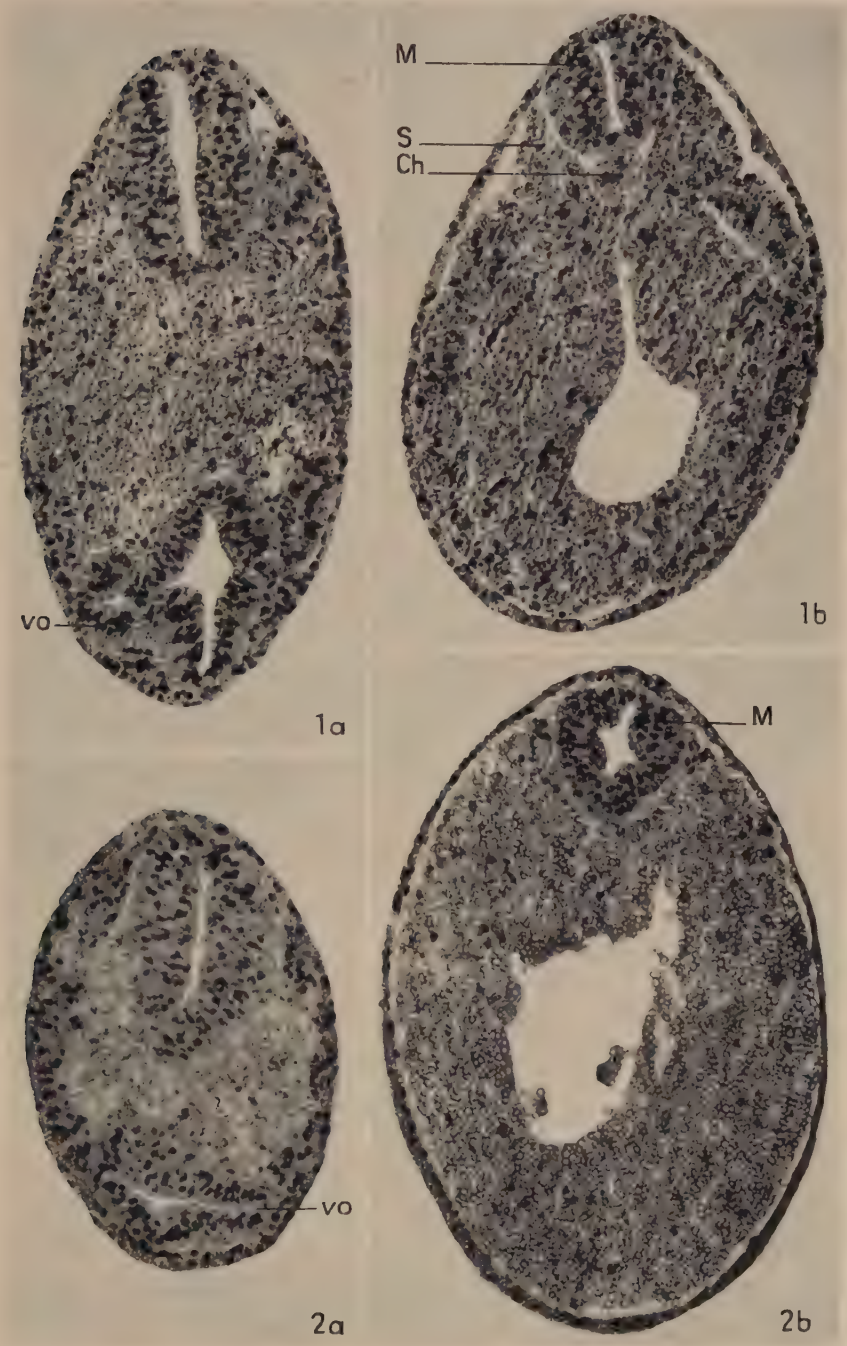

FIG. 7.

s'expliquer si l'on considère que l'irradiation de l'ébauche présomptive du système nerveux est en général incomplète (cf. fig. 5). La partie qui échappe à l'irradiation est précisément la zone présomptive des formations spino-caudales.

b) *Irradiation du territoire chordo-mésodermique.* — Dans cette série, nous avons irradié 140 embryons.

Le nombre de survivants après 4 jours est de 101 (72 %). Certains ont même été fixés 6 jours après l'irradiation. La gastrulation semble avoir été normale et, au stade neurula, il y a formation d'une plaque nerveuse

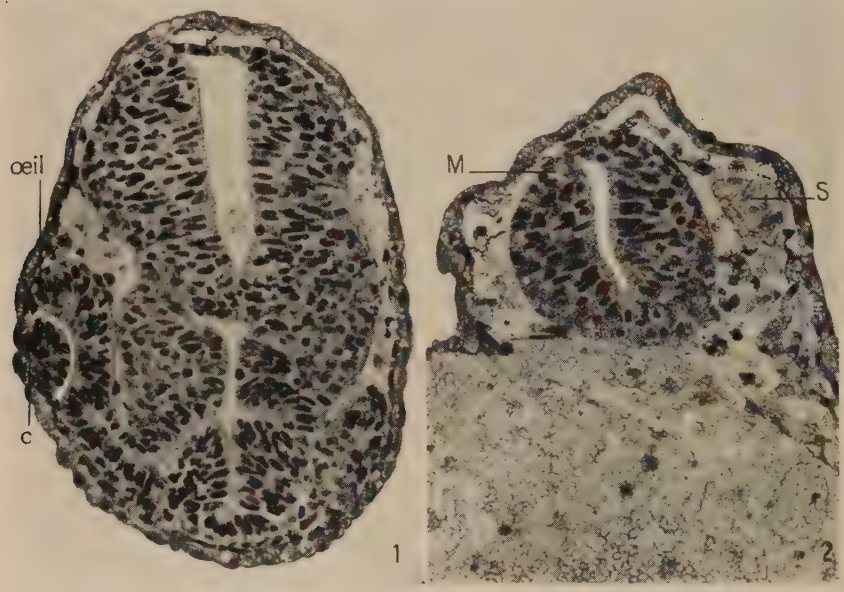

Fig. 8. — Embryon dont le pôle inférieur a été irradié à 1 170 r (6 jours après l'irradiation).

1. — Coupe transversale au niveau du diencéphale. On voit un œil assez bien formé avec son cristallin *(C.)*.

2. — Coupe transversale au niveau du tronc (détail). La moelle *(M.)* est bien formée, l'épiderme sain, mais on note l'absence totale de chorde et presque totale de somites *(S.)*.

(Gr. : × 135.)

très nette quoique parfois irrégulière et déficiente dans la région postérieure de l'embryon. Au stade de la fixation, ces embryons ont une apparence à peu près normale : la partie céphalique est bien différenciée avec des yeux souvent réduits mais visibles extérieurement; la région troncale présente peu de déficiences et seule l'extrémité postérieure est parfois réduite (fig. 2, cliché 2).

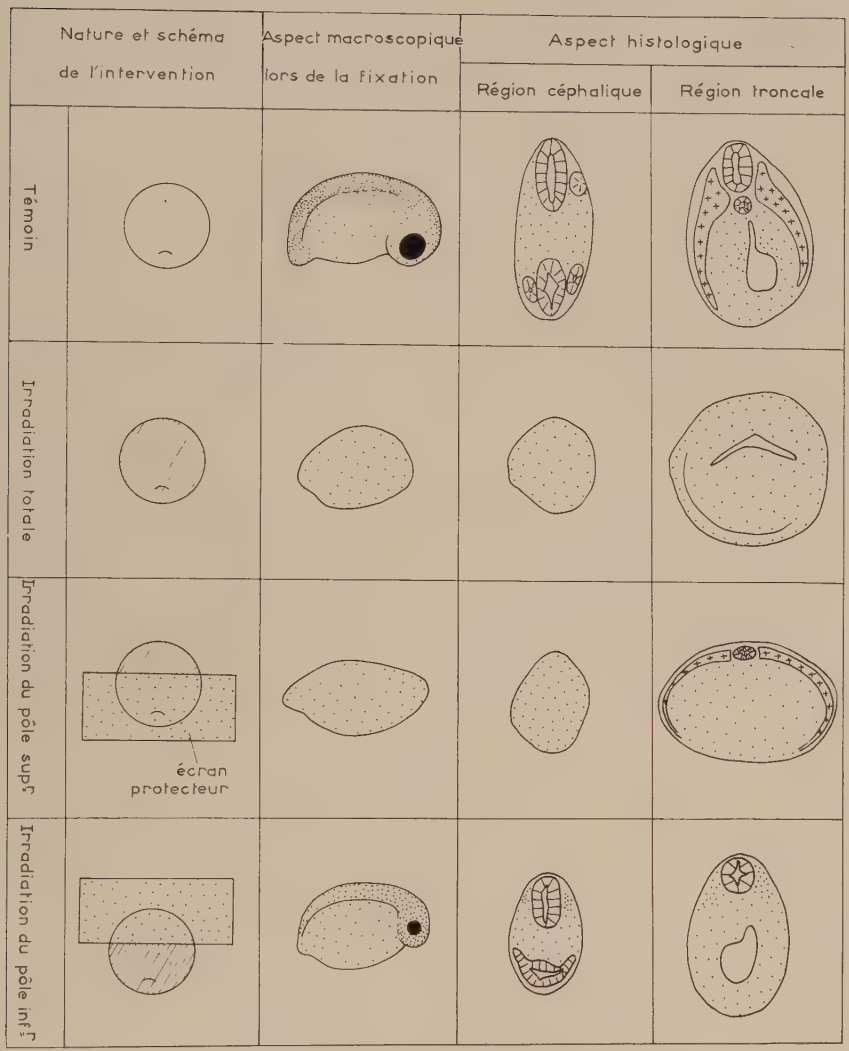

Fig. 9. — Résultats d'une irradiation de 1 170 r au stade jeune gastrula chez le Pleurodèle.

Comme chez tous les embryons irradiés, le développement embryonnaire est ralenti par rapport à celui des témoins.

Sur ces 101 embryons soumis à l'examen histologique, 10 seulement présentent des nécroses importantes et ont été éliminés. Les 91 embryons restants présentent tous des formations nerveuses importantes (100 %) quoique souvent réduites dans la région caudale. Ceci s'explique proba-

blement par le fait que l'irradiation a empiété sur le territoire ectodermique qui est justement susceptible de produire des différenciations nerveuses caudales (cf. fig. 5). La chorde est assez bien formée dans 44 cas (48 %) et réduite à quelques tronçons dans 14 cas (15 %). Elle est complètement absente dans 33 cas (37 %).

Les somites sont présents chez 45 embryons (50 %), mais ils ne sont à peu près typiques que chez 28 de ceux-ci (31 %). Voir tableau I; fig. 7, clichés 2 *a* et 2 *b*; fig. 8, clichés 1 et 2.

On voit donc qu'avec les doses de rayons X utilisées, l'irradiation du territoire chordo-mésodermique peut nuire à sa propre différenciation en chorde et somites, mais n'affecte pas son pouvoir inducteur, puisque dans 100 % des cas, on obtient des différenciations nerveuses à partir de l'ectoderme sus-jacent.

Résumé et conclusions

Une irradiation aux rayons X de 1 170 r de l'ectoderme de jeune gastrula supprime sa compétence à donner des formations nerveuses organisées dans 86 % des cas. Seule sa différenciation en épiderme peut s'effectuer.

Par contre, une irradiation de même intensité ne supprime pas le pouvoir inducteur de la lèvre blastoporale dorsale qui reste active dans 100 % des cas. Ces résultats sont schématisés dans la figure 9.

On peut conclure que l'absence de système nerveux chez une larve irradiée *in toto* provient de ce que les rayons X, appliqués au stade gastrula, suppriment la compétence de l'ectoderme sans affaiblir sensiblement le pouvoir inducteur de la lèvre blastoporale dorsale.

II. — *ÉTUDE DE LA PERTE DE COMPÉTENCE DE L'ECTODERME A DONNER DES STRUCTURES NERVEUSES APRÈS IRRADIATION AUX RAYONS X*

1° Introduction et historique

Nous avons montré dans la première partie de ce travail qu'une irradiation aux rayons X de 1 170 r supprime la compétence de l'ectoderme de jeune gastrula vis-à-vis des inducteurs neuraux.

Ce terme de « compétence » a été introduit par Ch. Waddington (1932) et défini par J. Holtfreter et V. Hamburger (1955) comme désignant « l'état physiologique d'un tissu lui permettant de réagir d'une façon spécifique à un stimulus déterminé ». Nous nous limiterons, dans ces chapitres, à l'étude de la « compétence primaire » neurale (Saxen et Toivonen, 1962) qui peut être définie comme la capacité que possède le

feuillet ectodermique, à un certain stade du développement embryonnaire, de « réaliser une différenciation neurale après stimulation » (Nieuwkoop, 1950). De nombreux auteurs ont étudié l'évolution de la compétence ectodermique dans le temps : Mangold (1929) implante des lèvres blastoporales dorsales dans des gastrulas de *Triturus vulgaris* de plus en plus âgées. Il constate une perte graduelle de la réactivité de l'ectoderme jusqu'au stade neurula où elle disparaît totalement.

Lehmann (1929) transplante dans la région de la plaque neurale des fragments d'ectoderme prélevés sur des embryons de plus en plus âgés. Il note une perte graduelle de compétence chez les explants âgés.

Machemer (1932) et Schechtman (1938) implantent des lèvres blastoporales dorsales sous l'épiderme ventral d'embryons d'âge croissant. Ils constatent une perte totale de réactivité au stade jeune neurula.

Plus récemment, P. D. Nieuwkoop (1958-1960), opérant sur *Ambystoma mexicanum,* fait une étude très détaillée, qualitative et quantitative, de la disparition progressive des structures céphaliques dans l'ectoderme vieillissant. D'après lui, la compétence neurale est présente dès le stade 7 (Harrison) et commence à se réduire au stade 11-11 1/2 en ce qui concerne les structures archencéphaliques et au stade 11 1/2 - 12 1/2 pour les structures deutérencéphaliques. Elle persiste probablement jusqu'au stade 15 (Sala, 1956) en ce qui concerne les structures spinocaudales.

D'autres auteurs font des observations identiques en étudiant la perte de compétence de l'ectoderme vis-à-vis d'un inducteur hétérogène, le foie de Triton (Raunich, 1942), et dans le cas d'induction sans inducteur (H. H. Chuang, 1955). Ce dernier auteur montre que de l'ectoderme isolé de *Cynops orientalis,* soumis à une influence toxique, se neuralise moins fortement s'il est âgé. Dès le stade neurula, on n'obtient aucune structure nerveuse. Par contre, dans ces conditions expérimentales, l'ectoderme est apte à se neuraliser dès le stade blastula moyenne.

Ces auteurs opèrent tous en soumettant à un stimulus inducteur de l'ectoderme prélevé sur des embryons à différents stades du développement. Une autre technique consiste à explanter de l'ectoderme de jeune gastrula et à le laisser « vieillir » *in vitro* avant de faire agir l'inducteur. Elle a été utilisée par J. Holtfreter (1938), J. Gallera (1952-1953) et récemment par A. Leikola (1963). Holtfreter cultive des explants d'ectoderme compétent de jeune gastrula de *Triturus alpestris,* immergés dans sa solution standard. Il les regreffe après des temps variables dans une jeune neurula : après 30 heures de culture, l'ectoderme est incapable d'édifier des formations cérébrales mais peut encore fournir des dérivés des placodes ectodermiques, de la crête neurale et des tissus neuroïdes. Après 50 heures, la réactivité des explants est nulle.

J. Gallera (1952), avec une technique un peu différente, arrive exactement aux mêmes conclusions.

Des explants ectodermiques sont implantés, après culture, sur la région

céphalique d'embryons dont l'ectoblaste a été enlevé. Ces greffons perdent brusquement leurs compétences ophtalmogènes, puis neurogènes lorsque les témoins arrivent au stade neurula. L'aptitude à donner des balanciers persiste un peu plus longtemps. Cet auteur suggère que la diminution de la réactivité de l'ectoblaste vieillissant pourrait être due à une « diminution progressive de la perméabilité des cellules ectoblastiques ». Cette hypothèse semble étayée par le fait qu'un traitement par l'urée, dont l'action perméabilisante est connue, permet de prolonger la période de compétence neurale jusqu'au stade neurula inclus (J. Gallera, 1953-1954).

Tout récemment, A. Leikola (1963) conjugue l'analyse de la perte de la compétence neurale à celle de la compétence mésodermique qui, jusqu'alors, n'avait pas été étudiée. Il soumet à l'action d'inducteurs hétérogènes des fragments d'ectoderme de *Triturus vulgaris* préalablement cultivés *in vitro* pendant des temps variables. Il constate que la perte de la compétence mésodermique survient très tôt chez les explants (après 15 heures de culture), alors que la perte de la compétence neurale ne se produit qu'après 24 heures de culture.

In vitro, la perte de compétence se fait donc suivant un processus différent de celui qui existe normalement dans la gastrula entière, et l'ectoderme *in vitro* doit être, suivant l'auteur, considéré comme un système biologique qui n'est pas nécessairement identique à l'ectoderme *in vivo*.

Parallèlement à ces recherches, quelques auteurs ont cherché à modifier expérimentalement la compétence ectodermique en vue de tenter d'élucider son mécanisme.

Outre les observations déjà mentionnées de Gallera (1953) sur l'action de l'urée, divers auteurs ont essayé d'obtenir une modification des propriétés ectodermiques sous l'action de diverses substances chimiques.

L'action du chlorure de lithium, en particulier, a été étudiée par divers chercheurs. Récemment, Masui (1956, 1959, 1960 *a*, *b*, *c*, 1961) et Ogi (1961) ont analysé son effet sur de l'ectoderme isolé de jeune gastrula de *Triturus*. Ils ont montré que les inductions archencéphaliques avaient tendance à disparaître après le traitement et étaient remplacées par des inductions de type spinocaudal, voire mésodermique et même endodermique.

S. Toivonen, J. Kohonen, J. Saukkonen, L. Saxen et T. Vainio (1961) constatent que le 5 fluoro-uracile inhibe la neuralisation de l'ectoderme de gastrula de *Triturus*.

J. Brachet et H. Denis (1963) éprouvent un inhibiteur de la synthèse de RNA : l'actinomycine D. Ils ne réussissent pas à bloquer le processus primaire d'induction neurale, mais obtiennent une dédifférenciation nerveuse dans les explants traités par l'antibiotique.

En collaboration avec le P^r Et. Wolff (1957), nous avions montré que les rayons X sont susceptibles d'inhiber complètement la différenciation

neurale chez des embryons irradiés à fortes doses et, ultérieurement (1962-1963), nous avions cherché à préciser l'effet d'irradiations plus modérées.

Provoquer, à l'aide de méthodes expérimentales, la disparition, l'affaiblissement ou la transformation de la compétence cellulaire, tel a été notre programme. Il devait nous permettre de répondre à quelques questions : s'agit-il d'un phénomène brusque ou progressif ? Dans cette deuxième hypothèse, y a-t-il une réduction parallèle des différentes formations neurales ou une disparition préférentielle de certaines d'entre elles. Nous avons procédé à des irradiations d'ectoderme de jeune gastrula à des doses progressivement décroissantes de rayons X et fait un examen histologique minutieux des embryons traités.

2° Irradiations de l'ectoderme de jeune gastrula a des doses de rayons X progressivement décroissantes

Matériel et techniques

Nous avons opéré sur de jeunes gastrulas de *Pleurodèle* (stades 8 *a* et *b* de Gallien et Durocher) et d'*Axolotl* (stades 10 et 10 1/2 de Harrison).

L'irradiation devant être faite avec le maximum de précision possible, nous avons modifié notre technique et utilisé le dispositif d'irradiation localisée mis au point par Et. Wolff (1936) pour l'irradiation de l'œuf d'Oiseaux (description fig. 10). Ce dispositif permet une très bonne localisation du rayonnement. Il est muni d'un prisme escamotable permettant de vérifier que l'œuf ne s'est pas déplacé pendant l'irradiation.

Pour les mesures d'intensité du rayonnement, il faut tenir compte de l'absorption, par le localisateur, d'une certaine quantité du rayonnement. Des mesures faites dans notre laboratoire, (J. M. Kirrmann, 1962) ont permis d'évaluer cette absorption à 30 % environ. Nous avons donc augmenté en conséquence le temps d'irradiation afin d'indiquer la dose de rayonnement réellement reçue par l'embryon et non celle émise par l'appareil, ce qui permet des comparaisons plus aisées avec les expériences réalisées à feu nu.

L'œuf est irradié latéralement, comme dans les expériences précédentes, et les doses de rayons X administrées sont de 1 050, 800, 550, 300 et 150 r, ce qui correspond, avec le localisateur et dans les conditions habituelles, à des temps d'irradiation de 1 mn 30 sec., 1 mn 8 sec., 47 sec., 25 sec. et 12 sec.

Les embryons sont élevés pendant 3 à 8 jours à la température de l'aquarium ou du laboratoire (15 à 22°) sans précautions spéciales. On enlève seulement le chorion au stade neurula âgée, ce qui permet l'élimination de cellules en voie de nécrose qui sont souvent expulsées lors de la gastrulation. C'est aussi à ce stade qu'on élimine les embryons présentant des signes extérieurs de nécrose. Le taux de mortalité est assez élevé dans toutes les séries, car nous avons cherché à élever les animaux le plus longtemps possible. Les fixations ont été échelonnées dans le temps, les animaux appartenant aux séries les moins irradiées ont été, d'une façon générale, fixés à des stades plus tardifs que les animaux fortement irradiés. Il faudra tenir compte de ce fait lorsqu'on voudra comparer la mortalité dans les différentes séries.

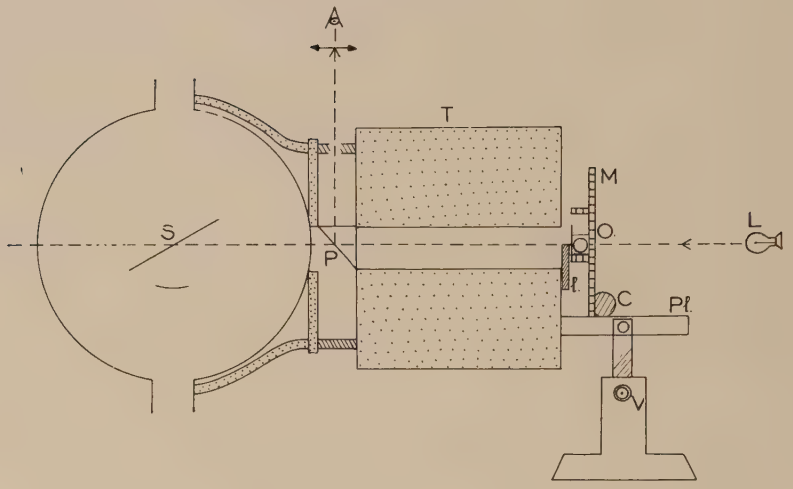

Fig. 10. — Dispositif d'irradiation localisée (d'après le dispositif mis au point par Et. Wolff (1936) pour l'irradiation de l'œuf d'oiseau).

Le tube *T* est vissé sur la fenêtre du tube Coolidge et centré en permanence sur l'anticathode. A sa partie supérieure, il présente un évidement dans lequel on peut loger un petit prisme à réflexion totale *P*. L'œuf étant éclairé par une source lumineuse *L*, l'œil contrôle, grâce au prisme *P*, la position de l'œuf par rapport au tube. L'œuf *O* est placé dans le microaquarium *M*, posé sur un plateau *Pl* dont on peut régler la hauteur grâce à une vis *V*. Une lamelle de plomb *l* sert à obturer la moitié supérieure ou inférieure de l'orifice du localisateur et permet d'irradier séparément la moité supérieure ou inférieure de l'œuf. Pour irradier l'œuf *in toto*, il suffit de la supprimer.

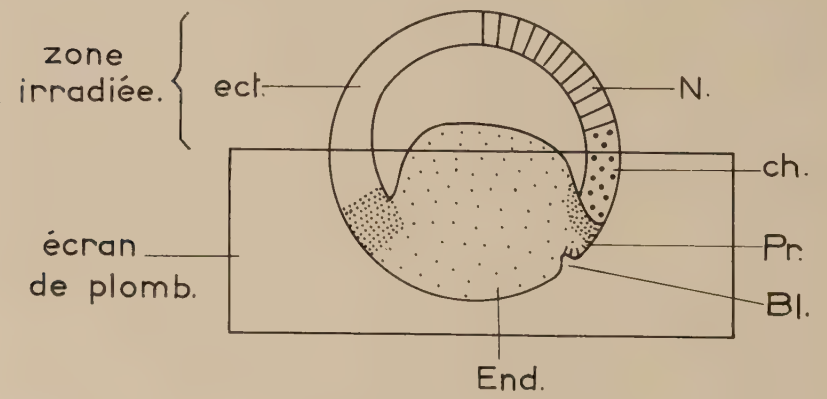

Fig. 11. — Schéma de l'irradiation de la calotte ectodermique : *B.*, blastocoele; *Bl.*, lèvre dorsale du blastopore; *Ch.*, chorde; *Ect.*, ectoderme; *End.*, endoderme; *N.*, territoire neural; *Pr.*, endoderme préchordal (d'après Vogt, 1929).

Résultats expérimentaux

a) *Irradiations de la calotte ectodermique.* — Les expériences rapportées dans cette série ont été faites sur des œufs de *Pleurodèle* et d'*Axolotl*. La calotte ectodermique a été irradiée plus largement que dans les expériences précédentes : seule la moitié inférieure de l'œuf a été protégée (fig. 11).

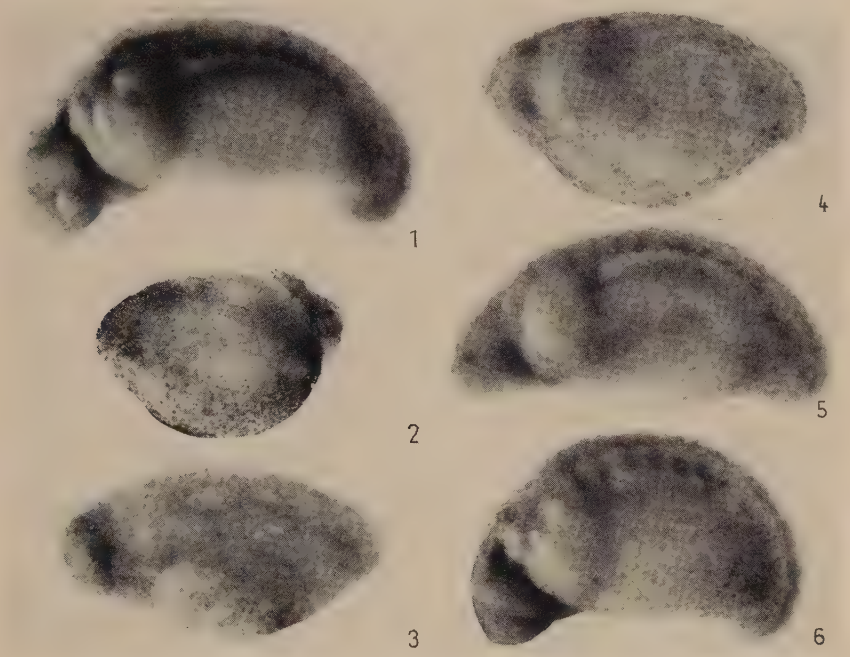

Fig. 12. — Embryons d'Axolotl dont la calotte ectodermique a été irradiée au stade jeune gastrula (3 jours après l'irradiation).

1. Témoin.
2. Embryon ayant reçu 1 050 r.
3. Embryon ayant reçu 800 r.
4. Embryon ayant reçu 550 r.
5. Embryon ayant reçu 300 r.
6. Embryon ayant reçu 150 r.

(Gr. : × 14.)

L'irradiation atteint la majorité des cellules ectodermiques, mais empiète légèrement sur le territoire chordo-mésodermique. Ceci est sans importance puisque l'on sait que des doses de rayons X supérieures à celles utilisées ici ne suppriment pas le pouvoir inducteur de la lèvre blastoporale dorsale.

Morphologie externe des embryons traités. — L'œuf irradié se distingue rapidement des témoins par des altérations de la pigmentation qui devient irrégulière et moins dense que chez les normaux. La gastrula-

tion semble s'effectuer normalement, bien que dans certains cas il y ait formation d'un bouchon vitellin anormalement gros qui marque une tendance de l'œuf à l'exogastrulation. Il finit généralement par se résorber complètement et le germe poursuit son évolution.

L'aspect anatomique des embryons obtenus après des irradiations du pôle animal, d'intensités décroissantes, est donné par les clichés de la figure 12.

On remarque une diminution de la longueur des embryons les plus fortement irradiés, alors que le diamètre du tronc reste sensiblement constant : si on superpose deux dessins faits à la chambre claire, l'un d'un embryon témoin, l'autre d'un embryon du même stade, modérément irradié (550 r par exemple), on constate que la réduction porte principalement sur la région céphalique chez le second (fig. 13).

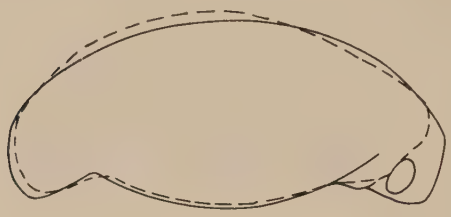

Fig. 13.

Comparaison entre un embryon témoin (———) et un embryon modérément irradié (-------). On voit que chez le second la région céphalique est fortement atrophiée.

Résultats histologiques

Irradiation de 1 050 r. — 38 gastrulas de *Pleurodèle* ont été irradiées, 13 ont survécu (mortalité, 66 %) et 10 ont fait l'objet d'un examen histologique.

Tous les embryons sont totalement dépourvus de cerveau, mais 5 possèdent une moelle rudimentaire (50 %) et 6 de la chorde et des somites (60 %) (fig. 14 : 1 *a*, 1 *b*, 1 *c*).

Légende de la figure 14.

1. — Embryon ayant reçu 1 050 r au pôle supérieur (Pleurodèle).

a) Coupe histologique au niveau du cerveau antérieur : aucune différenciation nerveuse. (Gr. : × 63.)

b) Le même embryon au niveau du cerveau postérieur. Pas de formations neurales. (Gr. : × 90.)

c) Le même embryon au niveau du tronc : il y a une très petite moelle *(M.)*, de la chorde *(Ch.)* et des somites *(S.)*. (Gr. : × 90.)

2. — Embryon ayant reçu 800 r au pôle supérieur (Pleurodèle).

a) Coupe histologique au niveau du cerveau antérieur : il y a une petite vésicule neurale extrêmement réduite *(arch.)*. (Gr. : × 63.)

b) Le même embryon, au niveau du cerveau postérieur : chez cet embryon, le deutérencéphale est absent. (Gr. : × 90.)

c) Coupe au niveau du tronc : les structures spinocaudales sont présentes quoique encore réduites. La moelle *(M.)* adhère à l'épiderme sus-jacent et les somites *(S.)* sont massifs. Il y a une chorde *(Ch.)*. (Gr. : × 90)

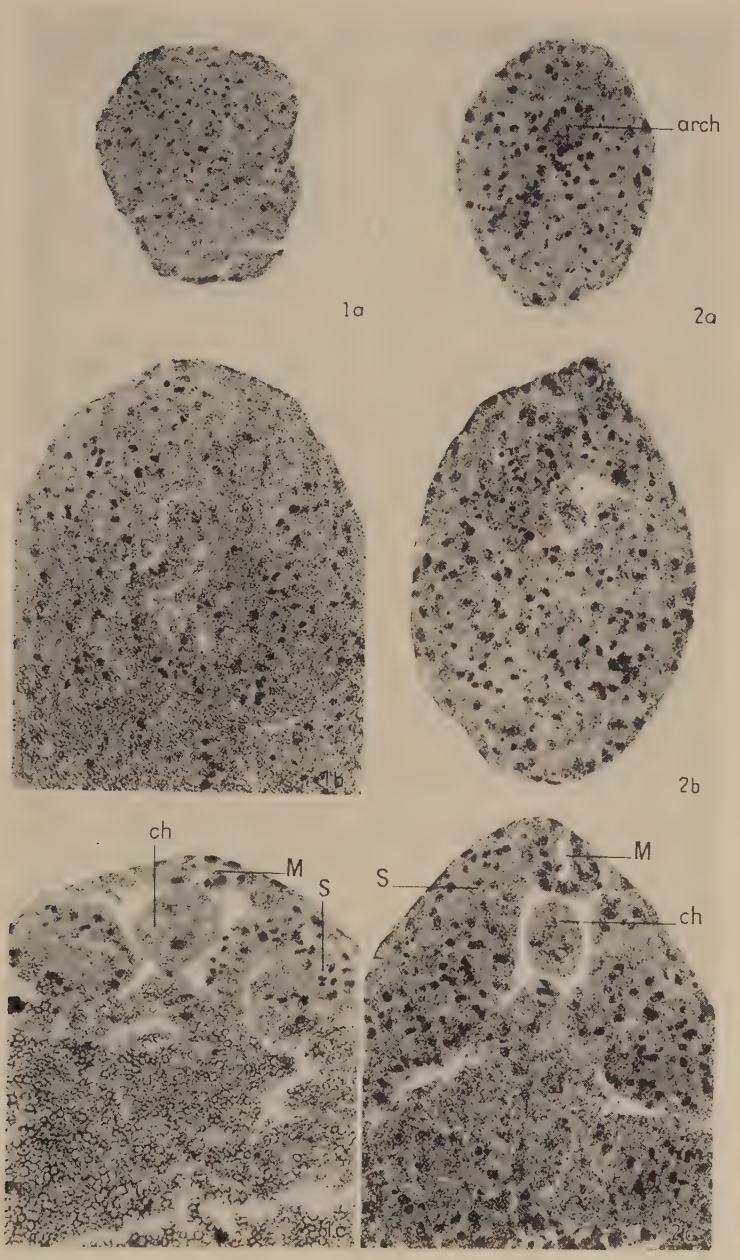

FIG. 14.

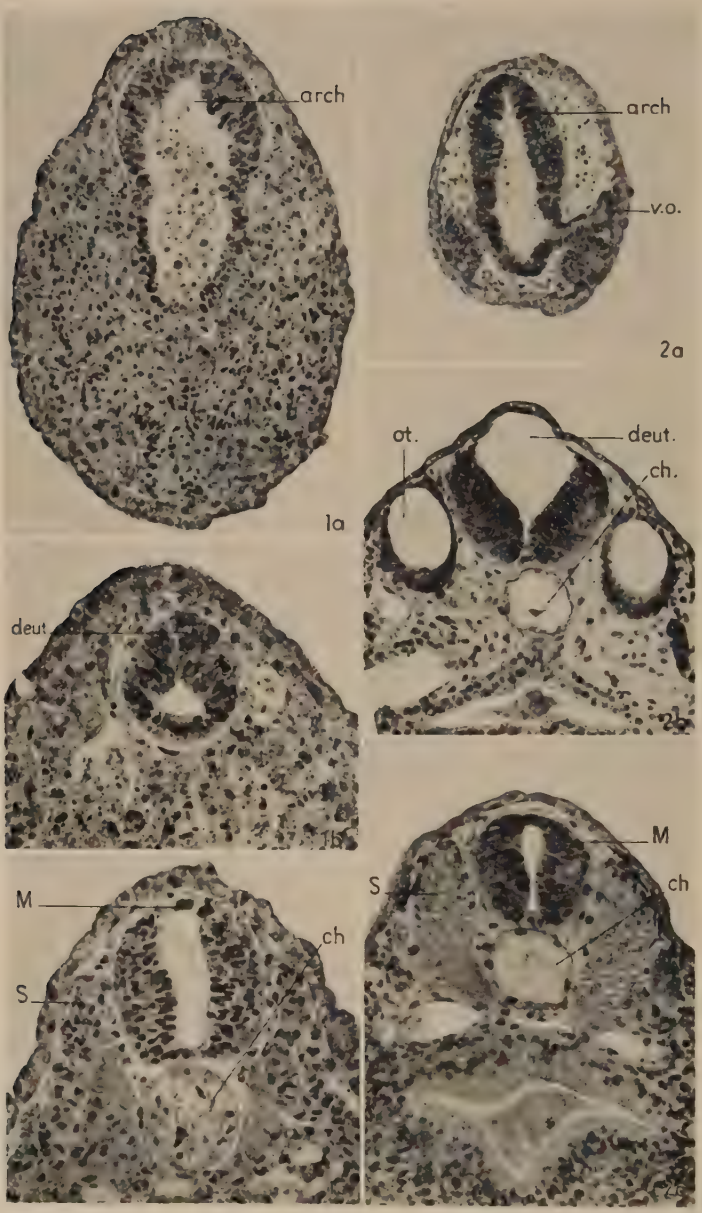

Fig. 15.

1. — Embryon ayant reçu 550 r au pôle supérieur (Axolotl).

a) Coupe histologique au niveau du cerveau antérieur. L'archencéphale *(arch.)* est présent mais dépourvu d'organes des sens. De plus, sa structure

— 50 gastrulas d'*Axolotl* ont reçu la même irradiation. Il y a 16 survivants (mortalité 68 %).

Tous sont dépourvus de formations nerveuses au niveau de la tête. 4 ont une moelle (25 %) et 7 de la chorde et des somites (44 %).

Irradiation de 800 r. — 47 œufs de *Pleurodèle* ont été irradiés. 30 ont survécu (mortalité 36 %) et 22 ont été soumis à un examen histologique. 4 d'entre eux (18 %) possèdent des rudiments de formations nerveuses au niveau de la tête. Il s'agit d'une ébauche mal différenciée, à aspect plus ou moins ganglionnaire ou, dans les meilleurs cas, d'une vésicule de petite taille avec ou sans lumière centrale et sans caractère de régionalité. La moelle, la chorde et les somites, souvent déficients, sont présents dans 100 % des cas (fig. 14 : 2 *a*, 2 *b*, 2 *c*).

— 50 œufs d'*Axolotl* ont reçu la même dose de radiations, 25 ont survécu (mortalité 50 %) et 19 ont subi un examen microscopique. Les formations céphaliques sont présentes dans 9 cas (47 %), mais toujours atypiques. La moelle, la chorde et les somites sont représentés dans 100 % des cas.

Irradiation de 550 r. — L'irradiation a été pratiquée sur 35 œufs de *Pleurodèle*. Il y a 29 survivants (mortalité 17 %). 16 ont été examinés au microscope. Les formations céphaliques sont présentes dans 7 cas (44 %) mais toujours atypiques. On observe en outre une interruption au niveau des structures présumées deutérencéphaliques dans 3 cas (19 %). La moelle, la chorde et les somites sont bien formés et présents dans tous les cas (100 %).

— Une irradiation de même intensité a été administrée à 65 œufs d'*Axolotl*, 40 ont survécu (mortalité 38 %). L'examen histologique de 38 d'entre eux a donné les résultats suivants : les formations nerveuses céphaliques sont présentes dans 22 cas (58 %). Dans 2 de ces cas, la

---

est fortement altérée et on aperçoit des cellules nécrosées dans la lumière du tube. (Gr. : × 63.)

b) Le même embryon au niveau du cerveau postérieur. Chez les embryons apppartenant à cette série expérimentale, le deutérencéphale *(deut.)* est présent dans environ la moitié des cas, mais il a l'aspect atypique illustré par ce cliché : toit épais, absence d'otocystes (Gr : × 90.)

c) Coupe au niveau du tronc. Belles formations spinocaudales. Moelle *(M.)*, chorde *(Ch.)* et somites *(S.)*. (Gr. : × 90.)

2. — Embryon ayant reçu 300 r au pôle supérieur (Pleurodèle).

a) Coupe histologique au niveau du cerveau antérieur. L'archencéphale *(arch.)* est présent mais réduit, et les vésicules oculaires *(V. O.)* sont restées à un stade très primitif. (Gr. : ×63.)

b) Le même embryon, au niveau du cerveau postérieur. Le deutérencéphale *(deut.)* est réduit mais accompagné d'otocystes *(ot.)*. (Gr. : × 90.)

c) Le même embryon au niveau du tronc. Belles formations spinocaudales. Moelle *(M.)*, chorde *(Ch.)* et somites *(S.)*. (Gr. : × 90.)

présence de diverticules optiques permet d'identifier de l'archencéphale. Au niveau du deutérencéphale par contre, dans 20 cas, les formations sont atypiques (53 %) et, dans 2 cas, il existe une interruption entre les structures archencéphaliques et la moelle.

La moelle, la chorde et les somites sont présents dans tous les cas (100 %) (fig. 15 : 1 *a*, 1 *b*, 1 *c*).

Irradiation de 300 r. — L'intervention a porté sur 42 œufs de *Pleurodèle*. 39 ont survécu (mortalité 7 %) et 30 ont subi un examen histologique.

Le cerveau est présent dans tous les cas. Dans 25 cas (84 %), des vésicules optiques rudimentaires et dans 18 cas (60 %) des vésicules olfactives permettent de caractériser de l'archencéphale. Les formations cérébrales sont cependant encore déficientes et restent très réduites et atypiques dans 5 cas (16 %).

Dans 27 cas (90 %), on peut observer des otocystes souvent massifs et conclure à la présence de deutérencéphale. Les formations nerveuses présentes à ce niveau restent atypiques dans 3 cas (10 %). Moelle, chorde et somites sont présents et normaux dans 100 % des cas (fig. 15: 2 *a*, 2 *b*, 2 *c*).

La même intervention a été pratiquée sur 33 œufs d'*Axolotl*. 10 se sont nécrosés (mortalité 30 %) et 22 ont été fixés en vue d'une étude au microscope. Le cerveau est présent dans 21 cas (95 %). Dans 17 de ces cas (77 %), la présence d'ébauches oculaires permet d'identifier de l'archencéphale et dans 14 cas (64 %) des otocystes attestent la présence de deutérencéphale.

La moelle, la chorde et les somites sont bien formés et présents dans 100 % des cas.

Irradiation de 150 r. — 10 gastrulas de *Pleurodèle* ont été irradiées. Toutes ont survécu.

Légende de la figure 16.

1. — Embryon ayant reçu 150 r au pôle supérieur (Axolotl).

a) Coupe histologique au niveau du cerveau antérieur. Les formations archencéphaliques *(arch.)* sont encore un peu réduites. L'œil gauche est à un stade très primitif, tandis que l'œil droit, quoique réduit, possède un cristallin *(C.)*. (Gr. : × 63.)

b) Le même embryon au niveau du cerveau postérieur. Deutérencéphale *(deut.)* typique avec un otocyste *(ot.)*. (Gr. : × 90.)

c) Le même embryon au niveau du tronc. Moelle *(M.)*, Chorde *(Ch.)* et somites *(S.)* normaux. (Gr. : × 90.)

2. — Embryon normal (Pleurodèle).

a) Coupe histologique au niveau du cerveau antérieur. Archencéphale *(arch.)*, yeux avec cristallins *(C.)*. (Gr. : × 63.)

b) Coupe au niveau du cerveau postérieur. Deutérencéphale *(deut.)* et otocystes *(ot.)* avec début de formation du canal endolymphatique. (Gr. : × 90.)

c) Coupe au niveau du tronc. Moelle *(M.)*, chorde *(Ch.)* et somites *(S.)*. (Gr. : × 90.)

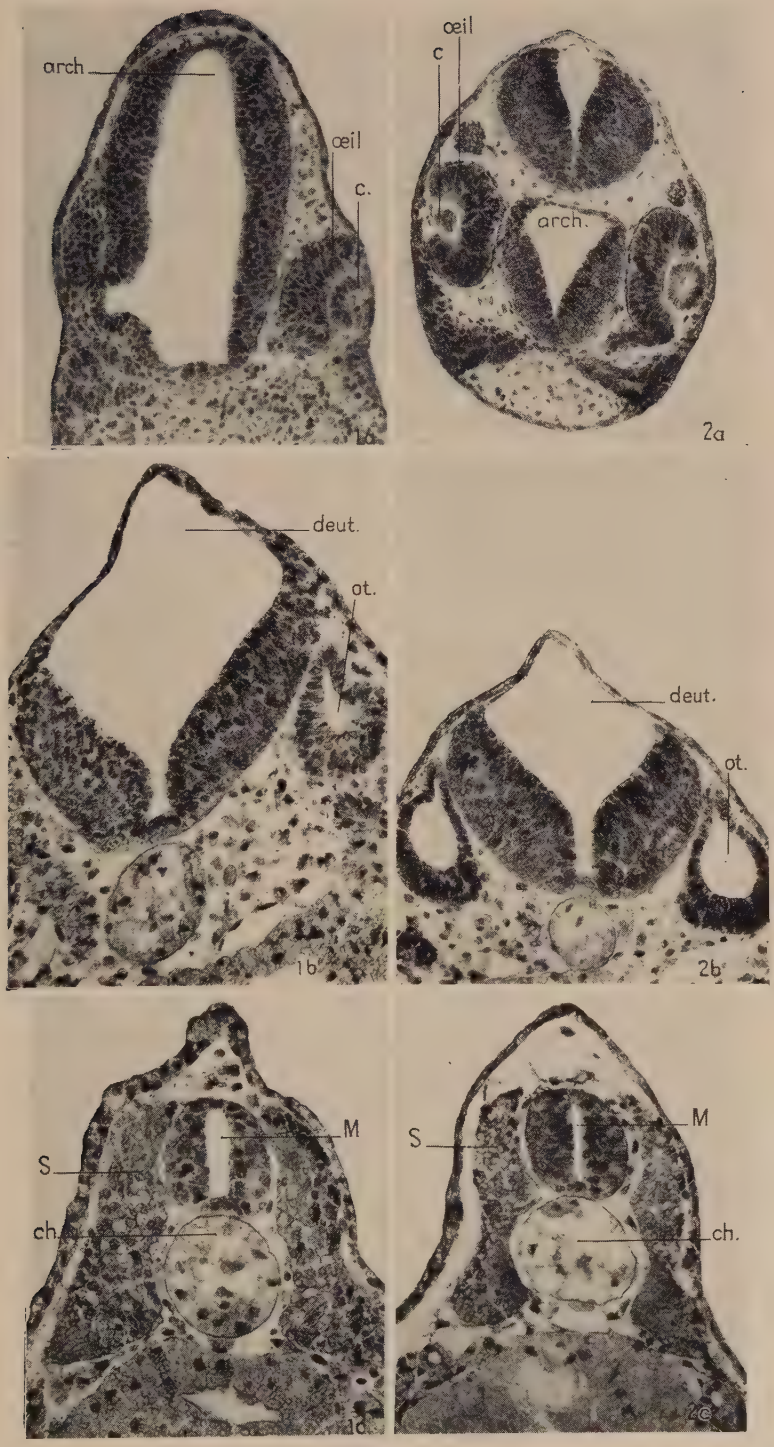

Fig. 16.

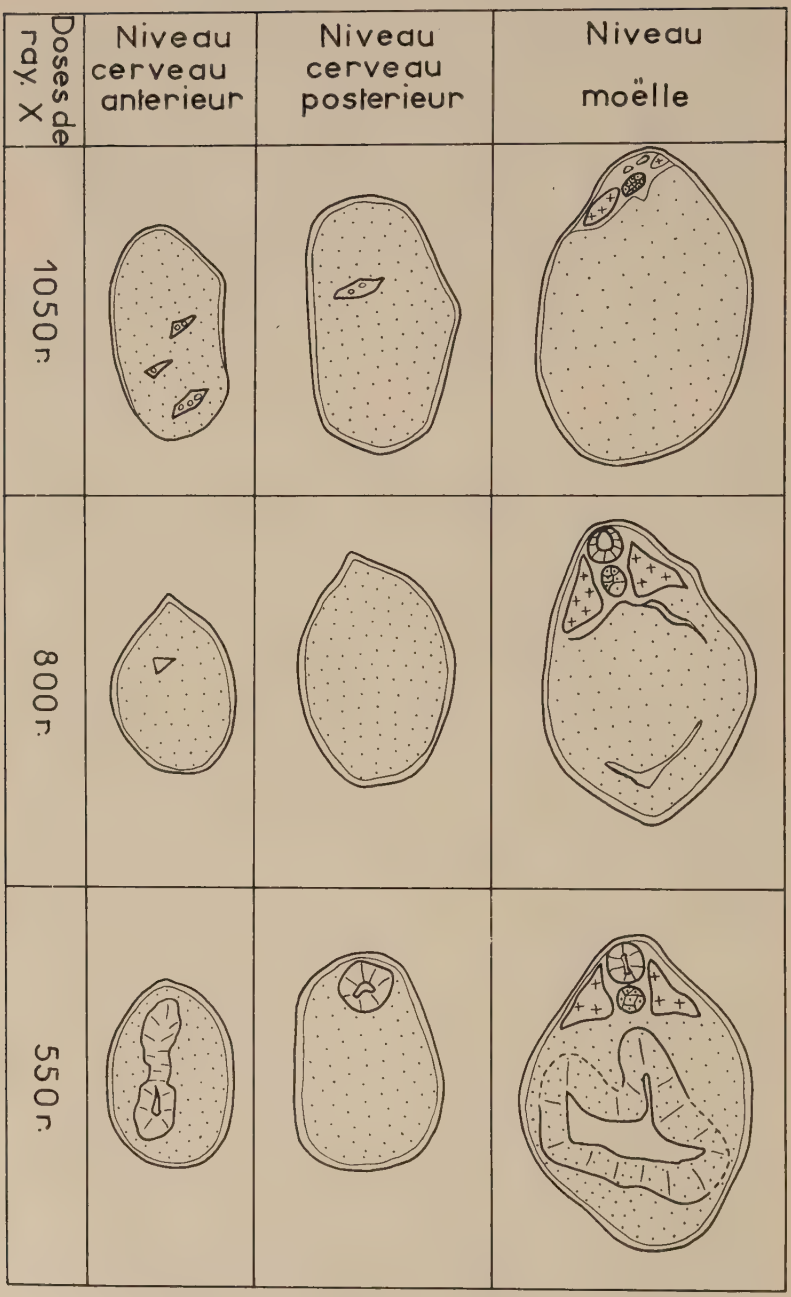

FIG. 17.

FIG. 17 et 18. — Résultats d'irradiations localisées de l'ectoderme de jeunes gastrulas.

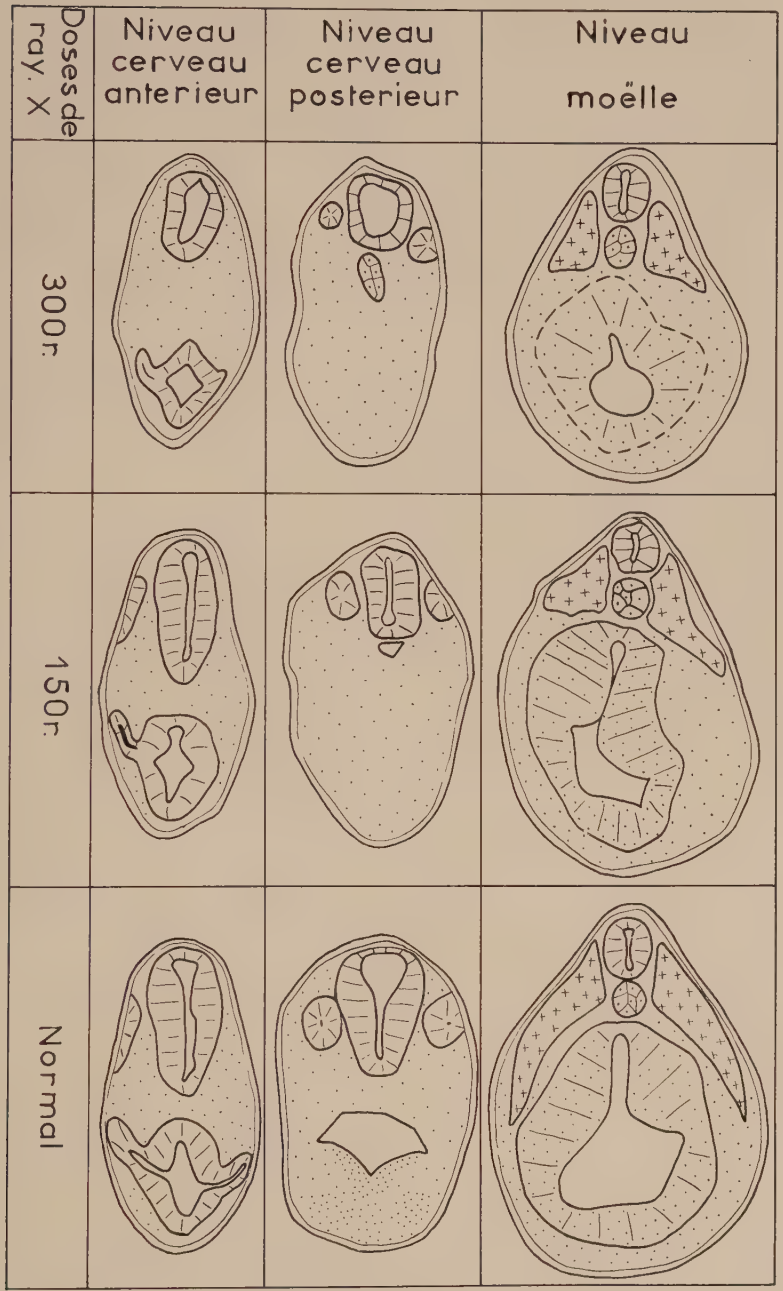
Doses de ray. X
Niveau cerveau anterieur
Niveau cerveau posterieur
Niveau moëlle
300r.
150r.
Normal

Fig. 18.

TABLEAU II

STRUCTURES DIFFÉRENCIÉES APRÈS DES IRRADIATIONS TOTALES OU LOCALISÉES DE JEUNES GASTRULAS

		Intensité de l'irradiation (en rœntgens)	Nombre de gastrulas soumises à l'histologie	Formations archencéphaliques						Formations deutérencéphaliques						Formations spinocaudales					
				Atypiques		Typiques				Atypiques		Typiques									
						Cerveau ant. et moy.		Organes des sens				Cerveau postérieur		Otocystes		Moelle		Chorde		Somites	
				Nb	%	Nb	%	Nb	%	Nb	%	Nb	%	Nb	%	Nb	%	Nb	%	Nb	%
Irradiations de la calotte ectodermique.	(Pleurodèle).	1 050	10	0	—	0	—	0	—	0	—	0	—	0	—	5	50	6	60	6	60
		800	22	4	18	0	—	0	—	4	18	0	—	0	—	22	100	22	100	22	100
		550	16	7	44	0	—	0	—	4	25	0	—	0	—	16	100	16	100	16	100
		300	30	5	16	25	84	25	84	3	10	27	90	27	90	30	100	30	100	30	100
		150	10	0	—	10	100	10	100	0	—	10	100	10	100	10	100	10	100	10	100
	(Axolotl.)	1 050	16	0	—	0	—	0	—	0	—	0	—	0	—	4	25	7	44	7	44
		800	19	9	47	0	—	0	—	9	47	0	—	0	—	19	100	19	100	19	100
		550	38	20	53	2	5	2	5	20	53	0	—	0	—	38	100	38	100	38	100
		300	22	4	18	17	77	17	77	7	31	14	64	14	64	22	100	22	100	22	100
		150	31	0	—	31	100	31	100	15	48	16	52	16	52	31	100	31	100	31	100
Irradiations totales.	(Axolotl.)	1 050	27	0	—	0	—	0	—	0	—	0	—	0	—	8	30	15	55	9	33
		800	22	3	14	0	—	0	—	3	14	0	—	0	—	22	100	22	100	22	100
		550	30	18	60	0	—	0	—	18	60	0	—	0	—	28	94	27	90	29	97
		300	21	12	57	3	14	3	14	11	53	4	19	4	19	21	100	21	100	21	100
		150	22	4	18	18	82	18	82	6	27	16	73	16	73	22	100	22	100	22	100

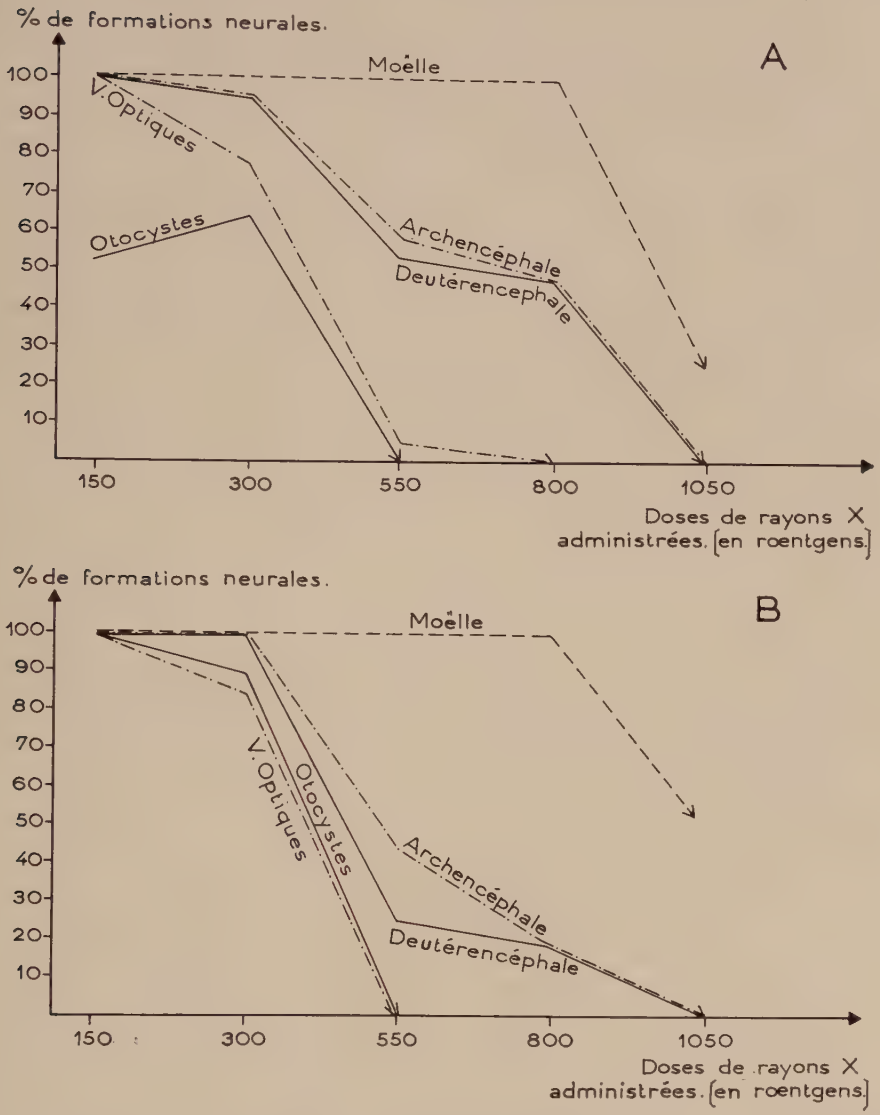

FIG. 19. — Perte progressive de la compétence neurale dans des gastrulas dont la calotte ectodermique a été irradiée (on a compté le total des cas positifs, formations neuroïdes incluses).

A, chez l'Axolotl; *B*, chez le Pleurodèle.

A l'histologie, le cerveau est bien représenté dans tous les cas (100 %). On peut identifier en allant de l'avant vers l'arrière : du télencéphale accompagné de vésicules olfactives, du diencéphale avec des yeux et du deutérencéphale caractéristique avec un plafond aminci et des vési-

cules auditives bien développées. Ces formations semblent avoir un volume normal mais aucune étude quantitative n'a été faite.

Moelle, chorde et somites sont normaux dans tous les cas.

— 42 gastrulas d'*Axolotl* reçoivent la même dose de rayons X. Neuf se nécrosent (mortalité 21 %) et 31 sont examinées histologiquement.

Les formations cérébrales existent dans tous les cas (100 %) mais présentent certaines déficiences. Les vésicules olfactives ne sont présentes que dans 7 cas (23 %), les yeux existent chez tous les embryons mais sont très fortement réduits. Le deutérencéphale est présent dans tous les cas (100 %), mais il n'est accompagné d'otocystes que dans 16 cas (52 %). Les formations spinocaudales sont normales chez tous les embryons de cette série (100 %) (fig. 16 : 1 *a*, 1 *b*, 1 *c*).

Nous avons schématisé ces résultats sur les figures 17 et 18. Les dessins présentés sont des cas réels choisis parmi les plus représentatifs de chaque groupe, au point de vue statistique. Les résultats numériques correspondants sont groupés dans le tableau II et les graphiques de la figure 19 permettent d'apprécier l'évolution de chacune des formations neurales chez le Pleurodèle et chez l'Axolotl.

Discussion

On voit que l'ectoderme irradié perd progressivement sa compétence vis-à-vis des inducteurs neuraux. Cette évolution se produit suivant les mêmes modalités chez l'Axolotl et chez le Pleurodèle, mais le phénomène est plus net chez le second qui est par ailleurs légèrement moins radiosensible, donc plus facile à élever après l'intervention. Les différentes structures disparaissent dans l'ordre suivant : Deutérencéphale, archencéphale, formations spinocaudales. En ce qui concerne le deutérencéphale, il est difficile d'expliquer sa disparition précoce. Notons seulement que l'on constate sa disparition totale chez des embryons possédant un rudiment d'archencéphale dans 5 % des cas chez le Pleurodèle et dans 19 % des cas chez l'Axolotl. Chez ces embryons, il y a donc une interruption des structures nerveuses au niveau du cerveau postérieur. En outre, les embryons qui possèdent des structures céphaliques complètes ont un deutérencéphale généralement moins bien développé que l'archencéphale. Par exemple, après une irradiation de 150 r chez l'Axolotl, le cerveau antérieur est présent et accompagné d'organes des sens dans 100 % des cas, alors que le cerveau postérieur également présent dans 100 % des cas n'est accompagné d'otocystes que dans 52 % des cas. Il y a cependant des exceptions : chez le Pleurodèle, après une irradiation de 300 r, les otocystes sont présents dans 90 % des cas, alors que les vésicules optiques ne le sont que dans 84 %. Dans la plupart des cas, la formation neurale présente au niveau du cerveau postérieur ressemble

beaucoup à de la moelle (tube arrondi régulier, ou structure typique de moelle avec murs épaissis, plancher et plafond amincis), mais s'en distingue généralement par un diamètre plus grand.

C'est pourquoi nous l'avons compté présent, à la différence de ce que nous avions fait pour nos premières publications dans lesquelles nous n'avions pas osé nous prononcer positivement.

La moelle, par contre, est toujours facilement identifiable, sauf dans la première série (1 050 r) où elle est fortement réduite dans tous les cas où elle existe (fig. 14, photo 1 *c*). Dans toutes les autres séries, elle est représentée dans 100 % des cas et dans les deux dernières séries (300 et 150 r), sa taille est pratiquement normale. Si l'on se reporte au schéma de l'irradiation (fig. 11), on peut craindre d'avoir, dans certaines séries, protégé par le cache de plomb une partie de l'ectoderme situé immédiatement au-dessus du chordo-mésoderme, celle-là même qui donnerait la future moelle. C'est assez peu vraisemblable, car l'œuf est très stable et on vérifie soigneusement sa position avant et après l'irradiation. Néanmoins, pour exclure tout doute à ce sujet, nous avons fait quelques séries additionnelles dans lesquelles l'œuf est irradié en entier.

b) *Irradiations totales de jeunes gastrulas.* — Elles ont été faites principalement sur l'*Axolotl*. Nous avons irradié *in toto* 199 jeunes gastrulas au stade habituel (st. 10-10 1/2 de Harrison) avec le même dispositif que précédemment, mais en supprimant l'écran de plomb protecteur. Elles sont réparties en 5 groupes :

Irradiation de 1 050 r. — 46 gastrulas ont été irradiées pendant 1 mn 30 sec. Comme dans les expériences précédentes, l'embryon, à quelques exceptions près, poursuit normalement sa gastrulation mais montre un peu de difficulté à résorber son bouchon vitellin. Au stade neurula, un petit sillon pigmenté indique seul l'emplacement du système nerveux. L'embryon s'étire légèrement dans le sens antéro-postérieur, mais ne semble pas pouvoir poursuivre son développement au-delà de 3 ou 4 jours et se nécrose rapidement. Dans cette série, 27 ont survécu jusqu'au 4e jour après l'irradiation (mortalité 41 %). L'histologie de ces embryons a révélé qu'il n'y a jamais de formations cérébrales mais que, dans 8 cas (30 %), on trouve une indication de formations nerveuses postérieures. Cependant, nous n'avons pu identifier de tube médullaire que dans 2 cas. Dans les autres cas, on a affaire à des formations neuroïdes ou à un petit amas dense de cellules nerveuses.

La chorde, plus ou moins fragmentaire, est présente dans 15 cas (55 %) et les somites dans 9 cas (33 %). Ces formations sont moins développées que dans les expériences d'irradiation partielle de l'œuf, ce qui se comprend aisément puisque, cette fois, tout le territoire chordo-mésodermique est touché par l'irradiation.

Irradiation de 800 r. — 43 gastrulas ont été irradiées pendant 1 mn 8 sec. Les embryons poursuivent normalement leur gastrulation, puis leur neurulation dans 22 cas, 21 se nécrosent avant d'atteindre le stade bourgeon caudal (mortalité 48 %). Les survivants ont une plaque nerveuse assez bien dessinée quoique très amincie dans la région céphalique. A l'histologie, on ne trouve de formations cérébrales que dans 3 cas (14 %). Elles sont rudimentaires et dépourvues d'organes des sens. La moelle est présente dans 22 cas (100 %), la chorde et les somites également.

Irradiation de 550 r. — 51 gastrulas sont irradiées pendant 47 sec. (550 r), 30 dépassent le stade neurula (mortalité 41 %). La plupart ont des bourrelets neuraux assez bien formés, sauf dans la région antérieure où ils sont très minces. A l'histologie, on trouve des formations cérébrales dans 18 cas (60 %), mais elles sont très rudimentaires et dépourvues d'organes des sens. La moelle est présente dans 28 cas (94 %), les somites dans 29 cas (97 %) et la chorde dans 27 cas (90 %). Cette légère chute du pourcentage des formations spinocaudales doit probablement être due à une série d'œufs provenant d'une ponte plus radiosensible. On constate en effet des variations d'une ponte à une autre, ou suivant la saison pendant laquelle on expérimente.

Irradiation de 300 r. — 32 gastrulas sont irradiées pendant 25 secondes. 21 survivent jusqu'au stade bourgeon caudal avancé (mortalité 35 %). A l'histologie, les formations cérébrales sont présentes dans 15 cas (71 %), mais restent dépourvues d'organes des sens. La moelle, la chorde et les somites sont présents et assez bien formés dans 100 % des cas.

Irradiation de 150 r. — 28 gastrulas sont irradiées pendant 12 secondes. 22 survivent (mortalité 21 %). A l'histologie, les formations archencéphaliques sont présentes dans tous les cas. Elles sont accompagnées de vésicules optiques dans 18 cas (82 %) et de vésicules olfactives dans 10 cas (45 %). Il y a du deutérencéphale dans tous les cas également, mais il n'y a d'otocystes que dans 16 cas (73 %).

La moelle, la chorde et les somites sont présents et semblent normaux dans tous les cas (100 %).

Conclusions

Ces résultats sont condensés dans le tableau II et schématisés par le graphique de la figure 20. En le comparant à celui de la figure 19, on voit que les choses se passent sensiblement de la même façon après une irradiation totale de l'œuf et après une irradiation localisée de la calotte

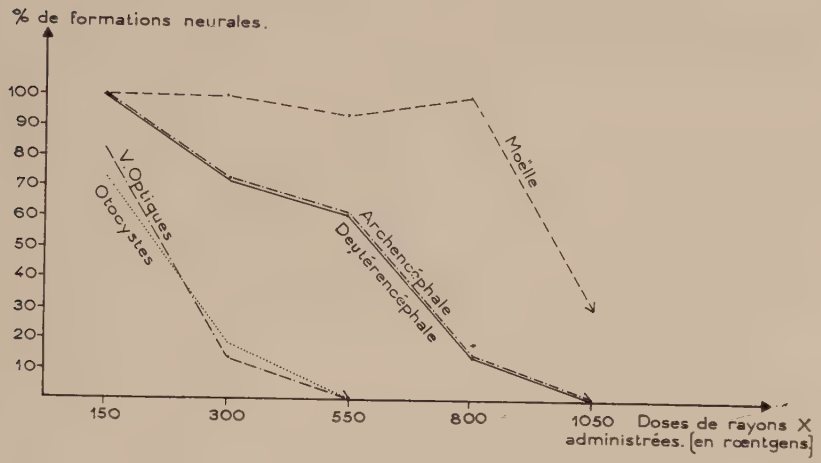

Fig. 20. — Perte progressive de la compétence neurale dans des gastrulas d'Axolotl irradiées *in toto*.

ectodermique, du moins en ce qui concerne les formations nerveuses. Leur disparition se fait dans le même ordre = structures céphaliques, puis spinocaudales.

Après une irradiation totale, l'embryon a une chorde et des somites moins bien développés et doit être fixé plus tôt car sa capacité de survie est un peu diminuée.

Résumé

Après une irradiation localisée de la calotte ectodermique ou après une irradiation totale de l'œuf, on constate une disparition progressive des formations nerveuses : les structures archencéphaliques commencent à disparaître après une irradiation comprise entre 150 et 300 r, elles sont rares et toujours privées d'organes des sens après une irradiation de 800 r et totalement absentes après une irradiation de 1 050 r. Les structures deutérencéphaliques ont une évolution à peu près parallèle bien que leur fréquence soit un peu moindre. Elles sont déficientes et dépourvues d'organes des sens après une irradiation de 550 r et sont toujours absentes après une irradiation de 1 050 r.

Les structures spinocaudales, au contraire, résistent à des irradiations de 150 à 800 r dans 100 % des cas (à quelques variations près dans la série des irradiations totales). Elles commencent à décroître après une irradiation de 800 r et, après une irradiation de 1 050 r elles sont encore présentes dans 25 et même 50 % des cas suivant les séries.

3° Association en parabiose d'animaux irradiés avec des animaux sains

Dans les expériences détaillées dans le chapitre précédent, nous avons surtout étudié ce qui se passe dans les jours qui suivent l'irradiation, ceci pour deux raisons : tout d'abord parce que nous voulions connaître la réaction première de l'ectoderme irradié, et ensuite parce que dans les séries fortement irradiées, les animaux survivent mal. Il était intéressant de compléter cette étude par l'examen d'embryons un peu plus évolués.

Matériel et méthodes

Nous nous sommes adressée à la technique des greffes en parabiose (R. K. Burns, 1925) que L. Gallien (1957) eut l'idée d'adapter à l'élevage de larves tératologiques : un embryon sain est associé en parabiose à un embryon malformé. De cette façon, le premier subvient aux besoins du second et on peut conserver ainsi des embryons incapables de survivre seuls.

Protocole opératoire. — Les expériences sont faites sur des œufs de *Pleurodèle*. L'irradiation est pratiquée au stade gastrula et localisée au pôle supérieur de l'œuf suivant la technique décrite au chapitre précédent. Les embryons irradiés et témoins sont élevés séparément dans de l'eau ordinaire jusqu'au stade jeune bourgeon caudal (st. 21-22). Les associations sont faites suivant la méthode classique dans de petites boîtes de Pétri dont le fond est recouvert de pâte à modeler stérilisée par un lessivage à l'alcool à 95° suivi de deux rinçages avec du Holtfreter stérile.

La parabiose est réalisée entre un embryon normal (autosite) et un embryon irradié (parasite). Les embryons, déchorionnés et lavés dans du Holtfreter stérile (2 bains de 5 mn), sont placés dans deux logettes voisines creusées dans la pâte à modeler.

On excise sur le flanc de chacun d'eux un petit volet épidermique situé en arrière du territoire des branchies et juste au-dessous des renflements somitiques.

Dans quelques cas, nous avons réalisé des télobioses qui consistent à associer les deux individus par leurs extrémités caudales.

Dans tous les cas, les deux embryons sont réunis dans une logette commune et les deux blessures mises en contact étroit l'une avec l'autre. La cicatrisation est parfois assez lente du fait que l'épiderme de l'embryon irradié est souvent déficient. On peut alors laisser les embryons en contact pendant un temps assez long sans craindre d'inconvénients (jusqu'à 15 heures).

De cette façon, la cicatrisation se fait bien dans au moins 70 % des cas. Les couples d'embryons sont élevés dans de l'eau ordinaire pendant 10 ou 15 jours. Ce délai est suffisant pour que les structures nerveuses soient bien différenciées.

Résultats expérimentaux

Nous avons effectué 4 séries de parabioses avec des embryons dont la calotte ectodermique avait été irradiée à 1 050, 800, 550 et 300 r. Nous n'avons pas associé en parabiose avec des animaux sains les embryons les plus faiblement irradiés (150 r) qui survivent fort bien seuls.

Etude anatomique. — Quelques exemples de ces associations sont donnés par les dessins de la figure 21, faits à la chambre claire. L'embryon irradié, de taille réduite par rapport à l'autosite, se développe cependant

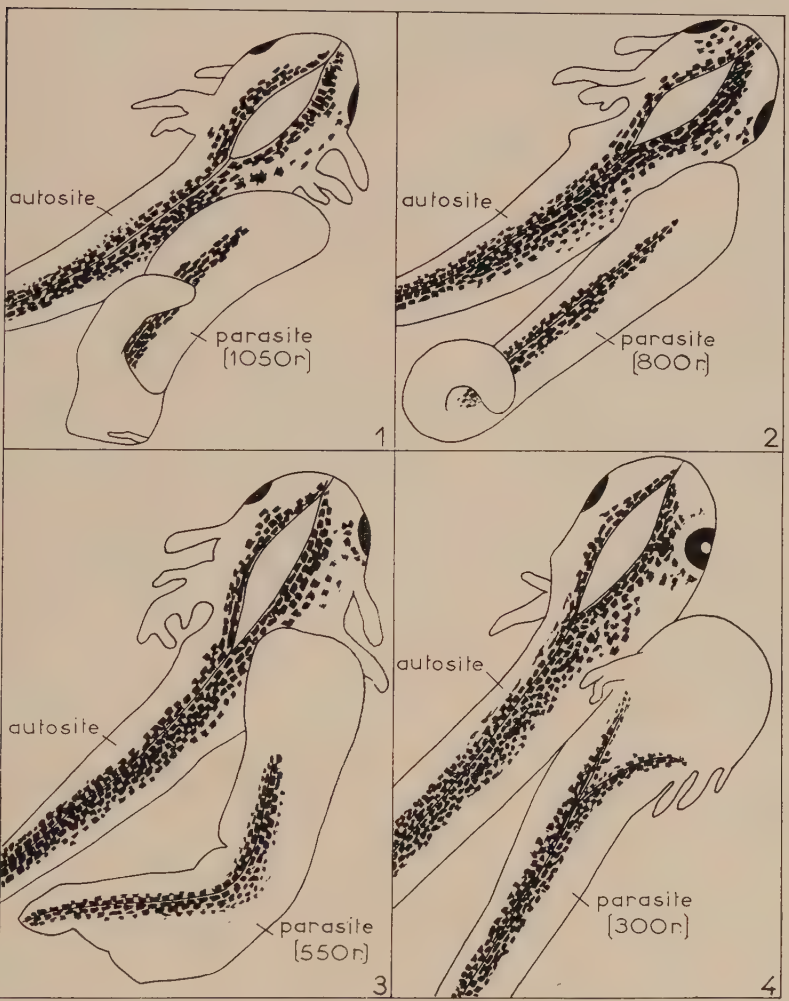

Fig. 21. — Parabioses d'embryons irradiés avec des embryons normaux.

de manière satisfaisante. Dans les séries fortement irradiées (fig. 21 : 1, 2, 3), on note l'atrophie considérable de la région céphalique. On a parfois l'impression qu'une queue isolée a été greffée sur l'embryon-porteur (fig. 22, cliché 1). Celle-ci est souvent de taille réduite et peu pigmentée.

Les embryons irradiés semblent tous anophtalmes, sauf ceux de la dernière série (300 r) qui ont parfois de très petits yeux visibles extérieurement.

Etude histologique. — Dans chaque série expérimentale, nous avons fait l'étude histologique de 10 embryons.

Série A : Association en parabiose d'un embryon sain à un embryon ayant reçu 1 050 r au pôle supérieur.

L'examen histologique montre que les embryons irradiés sont, dans cette série, tous dépourvus de formations céphaliques nettement identifiables. Dans 3 cas cependant, des formations nerveuses très postérieures, de taille très réduite et d'aspect ganglionnaire, semblent appartenir au cerveau. Mais le plus souvent, la région céphalique est complètement atrophiée et dans les formations axiales, c'est la chorde qui apparaît en premier, précédant l'apparition des muscles ou de la moelle (fig. 22, cliché 2).

Tous les embryons de cette série possèdent une moelle souvent bien développée, une chorde et des somites (fig. 22, cliché 3). Ils ont aussi, cœur, intestin et canaux de Wolff.

Série B : Association d'un embryon ayant reçu 800 r au pôle supérieur à un embryon normal.

Les embryons irradiés sont totalement dépourvus de formations cérébrales dans 3 cas sur 10.

Des formations archencéphaliques sont présentes dans 7 cas mais elles sont toujours atypiques et mal différenciées. Dans 4 cas, on ne trouve qu'une petite masse neuroïde à aspect ganglionnaire et, dans les 3 autres cas, une vésicule plus ou moins bien formée, à parois minces et sans organes des sens. Dans un cas cependant, il semble y avoir une ébauche avortée de diverticules optiques. Il est difficile de distinguer nettement ces formations des formations deutérencéphaliques qui sont présentes dans 6 cas et ont un aspect identique. Dans 4 cas cependant, ces dernières sont accompagnées d'un otocyste impair situé du côté de l'hôte dans 2 cas et du côté opposé dans les 2 autres cas.

La moelle, la chorde et les somites sont toujours présents et bien formés.

Série C : Association d'un embryon ayant reçu 550 r au pôle supérieur à un embryon normal.

Chez les embryons irradiés appartenant à ce groupe, les formations cérébrales sont présentes dans 9 cas sur 10. L'archencéphale est toujours réduit et dépourvu d'organes des sens. Le deutérencéphale est toujours très peu volumineux et mal différencié, mais dans 2 cas, il est accompagné d'otocystes; soit un otocyste impair situé du côté de l'autosite, soit de deux otocystes massifs mais nettement identifiables. La moelle, la chorde et les somites sont toujours présents et bien développés.

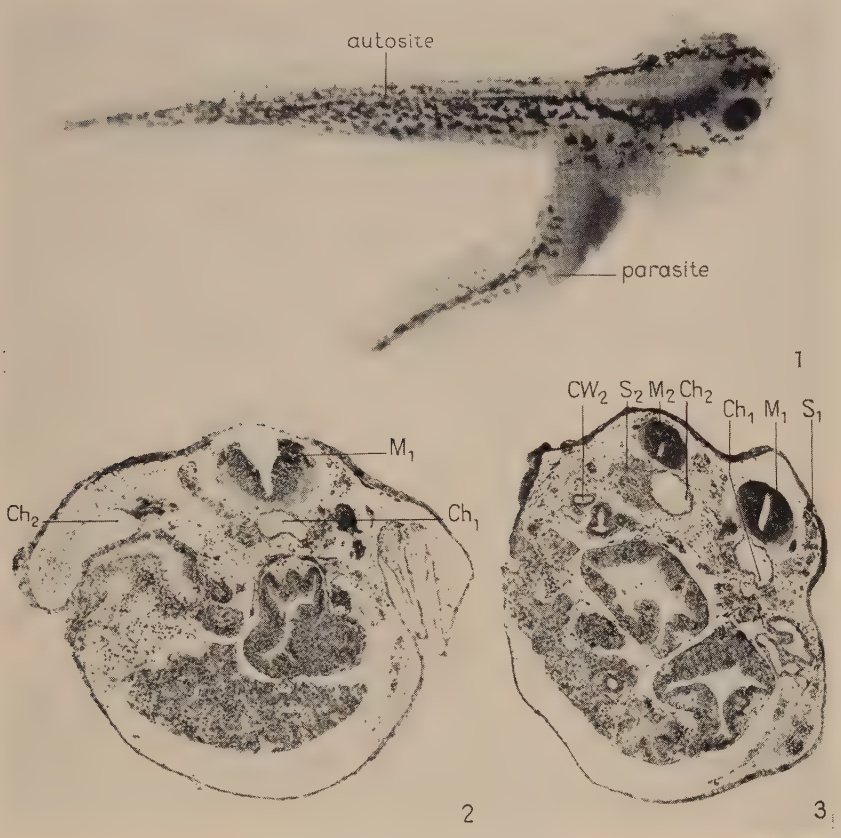

Fig. 22.

1. — Association en parabiose d'un embryon sain (autosite) et d'un embryon dont l'ectoderme a été irradié à 1 050 r au stade jeune gastrula (parasite) (Pleurodèle). 12 jours après l'association. La région céphalique de l'irradié est complètement atrophiée. (Gr. : × 11.)

2. — Coupe histologique au niveau du début des formations axiales chez l'embryon irradié. Il n'y a pas de cerveau. C'est la chorde *(Ch. 2)* qui apparaît en premier sur les coupes.
   Les organes de l'hôte sont désignés par le chiffre 1. Moelle *(M. 1)* et chorde *(ch. 1)*. (Gr. : × 30.)

3. — Coupe à un niveau plus postérieur : la moelle de l'embryon irradié *(M. 2)* est de taille un peu réduite, mais bien formée. Chorde *(Ch. 2)*, somites *(S. 2)* et canaux de Wolff *(C. W. 2)*. (Gr. : × 30.)

Série D : Association d'un embryon ayant reçu 300 r au pôle supérieur et d'un embryon sain.

Les embryons irradiés appartenant à cette série expérimentale possèdent tous des structures nerveuses assez bien développées mais encore

réduites dans la région céphalique. Le cerveau est accompagné d'organes des sens dans 9 cas sur 10. Il y a un télencéphale et des vésicules olfactives dans 8 cas. Le diencéphale émet des diverticules optiques très rudimentaires et les yeux semblent plus ou moins abortifs : ils ont la forme de petits haricots très peu volumineux et le cristallin ne se différencie que dans 2 cas. Le deutérencéphale est pourvu de vésicules auditives dans 9 cas, mais celles-ci sont très réduites. La moelle, la chorde et les somites sont toujours très bien développés.

Discussion et conclusions

Tous ces résultats sont condensés dans le tableau III. La comparaison de ces résultats avec ceux qui ont été obtenus avec des embryons élevés isolément montre quelques différences surprenantes qui sont illustrées par le graphique de la figure 23.

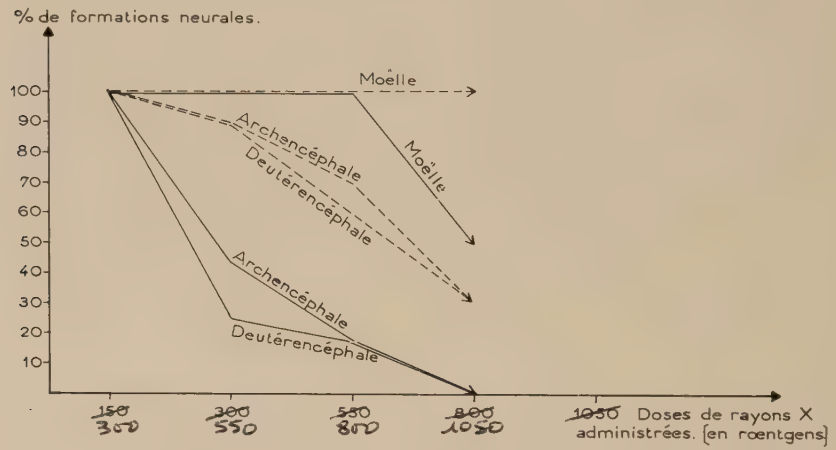

Fig. 23. — Perte progressive de la compétence neurale dans des gastrulas de Pleurodèles dont la calotte ectodermique a été irradiée.
Traits pleins : embryons élevés seuls.
Pointillés : embryons élevés en parabiose.

Chez l'embryon élevé seul, la moelle est réduite lorsque l'intensité de l'irradiation dépasse 800 r et semble totalement absente dans 50 % des cas lorsque l'irradiation atteint 1 050 r.

Après de telles irradiations, l'embryon élevé en parabiose est pourvu d'une moelle presque normale dans 100 % des cas.

Avec les structures céphaliques, il se produit un phénomène comparable :

— Après une irradiation de 550 r par exemple, l'embryon isolé possède des formations archencéphaliques dans 44 % des cas et deutérencépha-

liques dans 25 % des cas. Après une irradiation de même intensité, l'embryon mis en parabiose possède des formations archencéphaliques et deutérencéphaliques dans 90 % des cas.

— Après une irradiation de 1 050 r, les formations cérébrales disparaissent complètement chez les embryons élevés seuls, alors que les embryons mis en parabiose ont des formations cérébrales neuroïdes dans 30 % des cas.

L'embryon, élevé en parabiose, a donc tendance à reconstituer ses structures nerveuses.

Sans exclure une interaction possible entre les systèmes nerveux de l'hôte et de l'irradié, on peut rechercher une autre explication à ce phénomène.

Il est probable que les bonnes conditions physiologiques dans lesquelles se trouve l'embryon-parasite favorisent la réparation des radiolésions, du moins pour les cellules les moins atteintes. Celles-ci seraient ensuite capables de proliférer activement pour compenser la disparition des autres cellules.

Il s'agit probablement d'un processus secondaire de régulation qui n'est pas en contradiction avec les observations faites à des stades plus jeunes.

En ce qui concerne la sensibilité respective des structures spinocaudales et des structures cérébrales, ce phénomène ne change rien au résultat final et ces dernières gardent leur différence de sensibilité par rapport aux premières.

TABLEAU III

RÉSULTATS HISTOLOGIQUES OBTENUS SUR DES EMBRYONS DE PLEURODÈLE, DONT LE PÔLE SUPÉRIEUR A ÉTÉ IRRADIÉ AU STADE JEUNE GASTRULA ET QUI ONT ÉTÉ ASSOCIÉS EN PARABIOSE AVEC DES EMBRYONS SAINS

Intensité de l'irradiation (en roentgens)	Nombre d'embryons soumis à l'histologie	Formations cérébrales non identifiées	Formations archencéphaliques		Formations deutérencéphaliques		Formations spinocaudales		
			Atypiques	Typiques (+ yeux ou v. olfact.)	Atypiques	Typiques (+ otocystes)	Moelle	Chorde	Somites
1 050 r	10	3	—	—	—	—	10	10	10
800 r	10	—	7	—	2	4	10	10	10
550 r	10	—	9	—	7	2	10	10	10
300 r	10		1	9	1	9	10	10	10

Un autre point mérite d'être signalé : c'est la légère différence de radiosensibilité qui apparaît entre les cellules destinées à donner le cerveau antérieur et celles du cerveau postérieur. Dans presque toutes les séries expérimentales, le deutérencéphale est moins bien différencié que l'archencéphale. Parfois même, il est absent alors que le second existe.

Il est intéressant de souligner la sensibilité particulière des cellules de ce territoire.

4° Résumé

Lorsqu'on irradie, à des doses croissantes de rayons X, de jeunes gastrulas de *Pleurodèle* ou d'*Axolotl*, les structures nerveuses disparaissent progressivement et suivant un ordre déterminé. Cet ordre est le même si l'irradiation de l'œuf est totale ou si elle est localisée au territoire ectodermique compétent.

Les structures deutérencéphaliques disparaissent les premières, suivies de très près par les structures archencéphaliques. Une irradiation de 1 050 r suffit à les supprimer complètement les unes et les autres.

Les structures spinocaudales restent capables de se différencier, après une telle irradiation, dans 25 % des cas chez l'Axolotl et dans 50 % des cas chez le Pleurodèle.

En vue de faciliter la survie des animaux irradiés, nous les avons associés en parabiose à des animaux sains. Dans ce cas, on observe, après 10 ou 15 jours d'élevage, une restauration partielle des structures nerveuses.

Les formations cérébrales restent néanmoins très réduites par rapport aux formations spinocaudales et les conclusions énoncées sur la radiosensibilité régionale du système nerveux restent valables : lorsqu'on altère, par les rayons X, l'intégrité de l'ectoderme compétent de jeunes gastrulas, *ce sont les structures cérébrales qui disparaissent les premières.* Le blocage de la différenciation des formations nerveuses spinocaudales est plus difficile à obtenir et nécessite l'emploi de doses léthales de rayons X.

III. — *ÉTUDE DES POTENTIALITÉS DU TERRITOIRE INDUCTEUR CHORDO-MÉSODERMIQUE, APRÈS IRRADIATION AUX RAYONS X*

1° Introduction et Historique

Dans la troisième partie de ce travail, nous nous sommes attachée à l'étude des potentialités du territoire inducteur chordomésodermique après irradiation aux rayons X.

Nous avions constaté, lors de nos premières recherches, que l'irradia-

tion du pôle inférieur d'une jeune gastrula ne semble pas affecter son pouvoir inducteur. Ceci, à des doses de rayons X capables de supprimer presque totalement la compétence de l'ectoderme (1 170 r). Nous nous sommes demandé si les rayons X ne peuvent réellement pas supprimer ou modifier les capacités inductrices de la lèvre blastoporale dorsale, en particulier après de fortes irradiations.

Depuis la découverte par Spemann et Mangold (1921-1924) des capacités organisatrices de cette zone, de nombreux auteurs ont tenté, par divers procédés, d'en altérer les propriétés.

Spemann, le premier (1931 *b*), montre que l'intégrité des cellules n'est pas nécessaire et que l'organisateur dilacéré ou trituré reste actif. En 1932, Bautzmann, Holtfreter, Spemann et Mangold démontrent que l'organisateur tué par la chaleur, le froid, la dessiccation ou l'alcool conserve ses propriétés. Depuis, de très nombreuses études ont porté sur des inducteurs dénaturés. Elles sont trop nombreuses et trop classiques pour qu'on les rapporte ici (1). Nous nous contenterons de rappeler les principales.

Certains auteurs ont expérimenté sur les inducteurs naturels (Rollhauser Ter Horst, 1953; Hori et Nieuwkoop, 1955); d'autres, plus nombreux, ont utilisé des inducteurs hétérogènes. Les principales conclusions de ces travaux sont les suivantes : les inducteurs traités par la chaleur (Chuang, 1940; Rollhauser Ter Horst, 1953; Toivonen, 1954; Yamada, 1959), par l'alcool (Vahs, 1957; Hori et Nieuwkoop, 1955; Englander et Johnen, 1957), ou le formol (Kuusi, 1951), pour citer les principaux, subissent des transformations profondes qui aboutissent à des modifications de la régionalité des inductions obtenues. Les inductions mésodermiques disparaissent les premières suivies par les inductions spino-caudales et deutérencéphaliques. Les inductions archencéphaliques persistent plus longtemps que les autres mais finissent généralement par disparaître quand on prolonge le traitement.

Les observations de Spemann sur les effets régionaux obtenus avec différentes parties de l'inducteur naturel (inducteur céphalique et inducteur tronco-caudal) et ces résultats ont conduit la plupart des auteurs à admettre deux types principaux d'agents ou d'actions inductrices. L'un est le « facteur neuralisant » (N.) de Toivonen ou « principe activant » de Nieuwkoop qui, seul, induit des structures archencéphaliques. Le second est le « facteur mésodermisant » (M.) de Toivonen ou « principe de transformation » de Nieuwkoop. Lorsqu'il agit seul, il induit des structures mésodermiques.

C'est l'association des deux facteurs qui permettrait la différenciation du deutérencéphale et de la moelle épinière.

(1) On trouvera des mises au point détaillées dans les récents ouvrages de L. Gallien (1958) et de Saxen et Toivonen (1962).

L'agent neuralisant est relativement peu spécifique et son action peut être reproduite par différents agents chimiques et physiques. Il est dialysable et thermostable. Le facteur mésodermisant, thermolabile, est inactivé ou transformé en facteur neuralisant par divers traitements.

Selon YAMADA, ces expériences ne permettent pas de préciser si chaque effet régional est dû à un agent spécifique ou est sous la dépendance d'un agent unique qui se transformerait pour donner les différents types d'induction.

En ce qui concerne la nature chimique des inducteurs, la théorie généralement admise est celle des protéines (HAYASHI, 1958, 1959; TIEDEMANN, et TIEDEMANN, 1959; YAMADA et TAKATA, 1961; YAMADA, 1962).

On sait peu de choses sur le mode d'action des inducteurs. YAMADA (1962) pense que les agents inducteurs agissent sur la synthèse de l'ARN dans le noyau, donc sur la synthèse des protéines dans le cytoplasme des cellules ectodermiques.

2° GREFFES DE LÈVRES BLASTOPORALES DORSALES IRRADIÉES OU NORMALES DANS UN FRAGMENT D'ECTODERME SAIN

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Nous avons opéré, comme précédemment, sur de jeunes gastrulas de *Pleurodèle* et d'*Axolotl*.

On prélève l'ectoderme au début de la gastrulation (st. 8 *a* chez le Pleurodèle). La lèvre blastoporale dorsale est excisée sur des embryons un peu plus âgés (st. 8 *b*). Nous nous sommes abstenue de dépasser ce stade, car il importait que le greffon soit capable d'induire des structures aussi complètes que possible.

Il fallait donc, d'après la théorie de la régionalisation de l'induction (SPEMANN, 1927, 1931), qu'il contienne encore la plaque préchordale pour pouvoir induire des structures céphaliques. La technique utilisée est celle des « sandwichs » (HOLTFRETER, 1933 *b*) : l'ectoderme excisé est replié sur lui-même de façon à former une petite vésicule dans laquelle on introduit le fragment de lèvre blastoporale dorsale (fig. 24). Ce dernier est maintenu en contact étroit avec

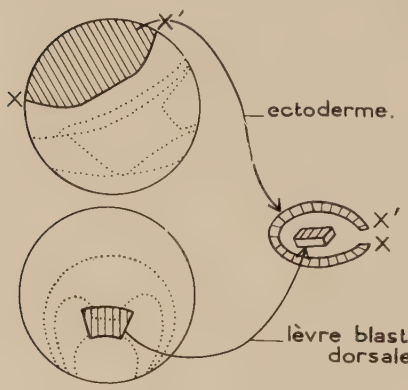

FIG. 24. — Schéma de l'opération : la ligne XX' délimite dans l'ectoderme la surface excisée.

la face interne de l'ectoderme. La cicatrisation intervient rapidement (1 heure au maximum), et l'explant est cultivé pendant 2 ou 3 semaines dans du liquide de Holtfreter stérile, renouvelé chaque jour.

Cette méthode présente l'avantage d'exclure toute action des organisateurs de l'hôte. Toutes les différenciations que l'on trouve dans le matériel réacteur sont dues à l'action de l'inducteur. Sans inducteur, l'explant ne peut se différencier et reste purement épidermique.

Résultats expérimentaux

Nous avons réalisé 2 séries témoins et 3 séries expérimentales.

a) *Première série témoin (T1) : culture d'ectoderme présomptif isolé.* On prélève un fragment d'ectoderme présomptif de jeune gastrula

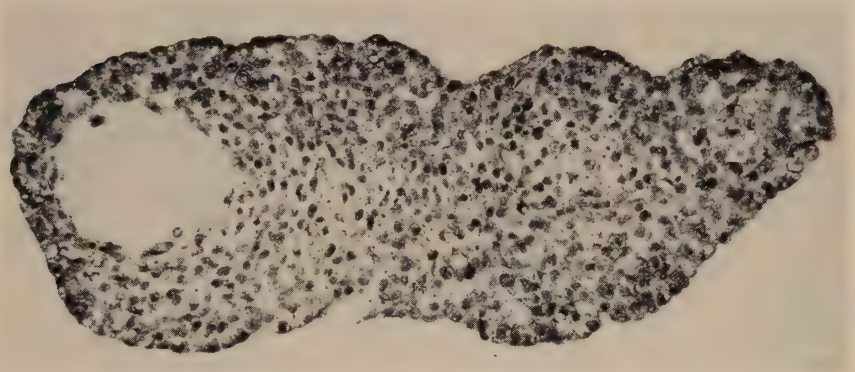

Fig. 25. — Explant de la série T1. Culture d'ectoderme normal isolé. Coupe histologique : l'explant reste massif et indifférencié. (Gr. : × 90.)

(fig. 24). On le replie sur lui-même de façon à obtenir une petite vésicule et on le cultive dans les mêmes conditions que ceux des séries expérimentales correspondantes.

Nous avons réalisé 45 explants.

Après quelques jours de culture, ces explants ont un aspect caractéristique « en peau d'orange », avec parfois de petites hernies vésiculeuses et transparentes. A l'histologie, on constate que tous les explants se sont différenciés en épiderme atypique ainsi que l'avaient déjà observé Holtfreter (1933 *a* et *b*, 1938) et de nombreux auteurs (fig. 25).

b) *Deuxième série témoin (T2) : greffe de lèvre blastoporale dorsale normale dans un fragment d'ectoderme normal.*

Dans cette deuxième série témoin, la lèvre blastoporale implantée ne subit aucun traitement préalable. Ceci nous a permis de vérifier les poten-

tialités inductrices du territoire chordomésodermique excisé. Après 2 ou 3 semaines de culture, ces explants ont une morphologie externe très accusée : on reconnaît généralement une région céphalique assez sombre avec 1 ou 2 balanciers et une région tronco-caudale très nette, allongée en une véritable queue souvent pourvue de nageoires. Les chromatophores sont abondants (fig. 26, cliché 1). Lorsque la culture est maintenue assez longtemps, les explants sont capables de réagir à la piqûre d'une aiguille, par des contractions. 44 de ces explants ont été soumis à un examen histologique qui a confirmé l'existence de belles formations neurales et mésodermiques (fig. 27, clichés 1 et 2).

Le cerveau antérieur est présent dans tous les cas et accompagné de fossettes olfactives dans 38 cas (86 %), dont 20 formations paires. Les yeux sont présents dans 42 cas (95 %).

Dans 20 de ces cas, il y a 2 yeux présents.

Le cristallin est différencié dans 14 cas (32 %). Dans 7 de ces cas, il n'y a qu'un cristallin et, dans les 7 autres, il y en a un par œil.

Le cerveau postérieur est présent dans 43 cas (98 %) et accompagné d'otocystes dans 36 cas (82 %). Ces vésicules auditives vont par paires dans 17 cas.

La moelle est bien développée dans 43 cas (98 %) et on trouve des *somites* et de la *chorde* dans 40 cas (91 %).

Nous avons ensuite réalisé 3 séries expérimentales en utilisant des lèvres blastoporales dorsales irradiées aux rayons X.

L'embryon donneur est irradié *in toto*. La lèvre blastoporale est excisée et implantée sans délai dans un fragment d'ectoderme prélevé sur un embryon non irradié.

Dans une première série : A, la lèvre blastoporale reçoit 1 170 r (1 mn

---

Légende de la figure 26.

1. — Explant témoin (Série T2) obtenu par la greffe d'une lèvre blastoporale dorsale normale dans un fragment d'ectoderme de jeune gastrula. Il y a une région céphalique avec des balanciers *(bal.)*, un tronc et une queue *(q.)*.
2. — Explant de la série A (Greffe d'une lèvre blastoporale dorsale irradiée à 1 170 r dans une calotte ectodermique de jeune gastrula). Il y a les mêmes différenciations régionales en tête avec balanciers *(bal.)*, tronc et queue *(q.)*; cette dernière possède ici une nageoire *(nag.)*.
3. — Explant de la série B (greffe d'une lèvre blastoporale dorsale irradiée à 30 000 r dans une calotte ectodermique de jeune gastrula). Les balanciers ne sont pas visibles sur la photographie. On voit les organes axiaux par transparence au niveau de la queue *(q.)*.
4. — Explant de la série C (greffe d'une lèvre blastoporale dorsale irradiée à 150 000 r dans une calotte ectodermique de jeune gastrula). La morphologie externe de cet explant est très voisine de celle des précédents. Il possède une région céphalique avec des balanciers *(bal.)*, un tronc et une queue *(q.)*. (Gr. : ×23.)

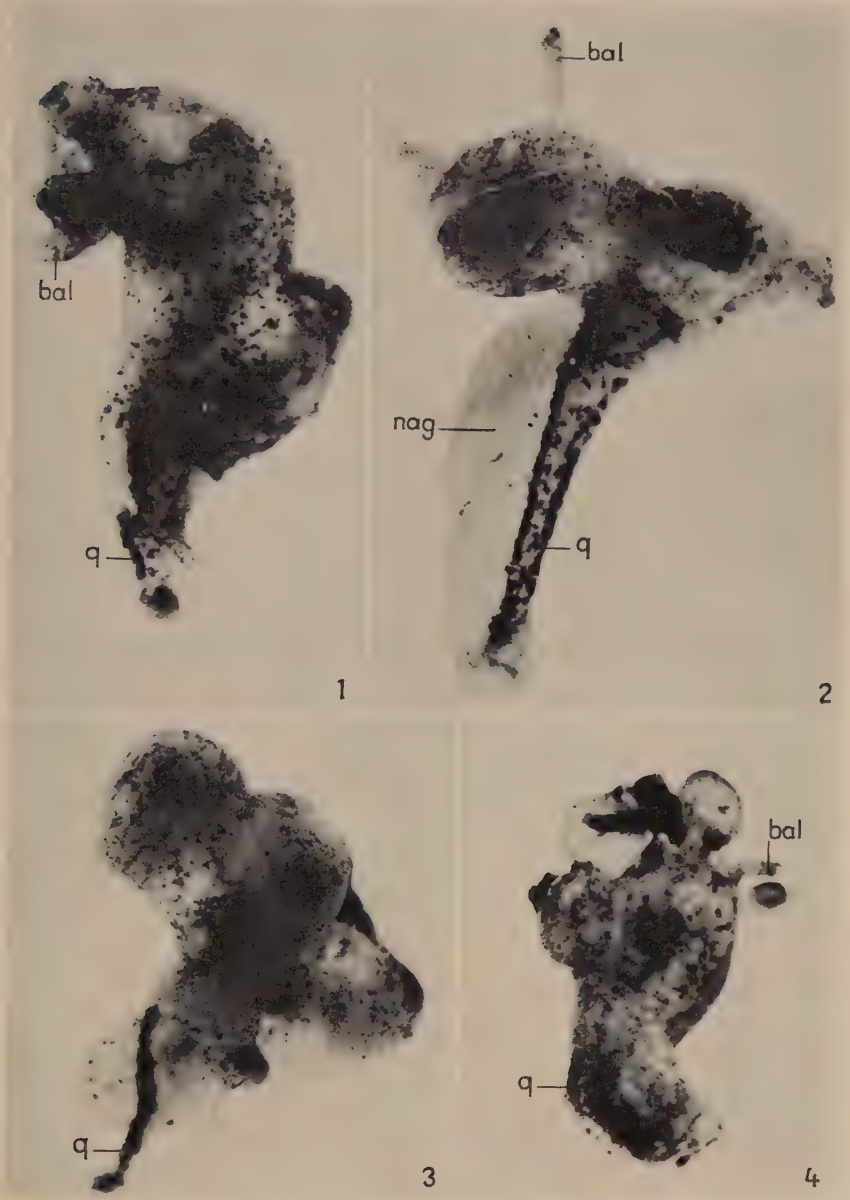

FIG. 26.

Fig. 27. — Explant de la série T2 (greffe d'une lèvre blastoporale normale dans un fragment d'ectoderme de jeune gastrula). (Gr. : ×90.)

1. — Coupe histologique au niveau des formations céphaliques : Archencéphale *(arch.)*, œil avec cristallin *(C.)*.

2. — Coupe au niveau de la région antérieure du tronc. Quelques formations deutérencéphaliques *(deut.)* avec des otocystes *(ot.)*, de belles formations spinocaudales : Moelle *(M.)*, chorde *(Ch.)* et somites *(S.)*.

10 sec. d'irradiation, sans localisateur et dans les conditions habituelles). C'est une dose de rayons X qui suffit à supprimer presque totalement la compétence ectodermique. Nous voulions, grâce à la technique précise de l'explantation *in vitro*, vérifier si cette dose est réellement sans effets sur le pouvoir inducteur du territoire chordomésodermique, ainsi que

les expériences d'irradiations localisées nous l'avaient fait supposer.

Dans les deux séries suivantes, la lèvre blastoporale dorsale reçoit 30 000 r : série B (30 mn d'irradiation à feu nu) et 150 000 r : série C (2 h. 30 mn d'irradiation).

Ces séries devaient nous permettre d'éprouver l'effet des rayons X sur le pouvoir inducteur des explants chordomésodermiques à des doses où la survie cellulaire n'est plus possible.

c) *Série A : greffe d'une lèvre blastoporale dorsale irradiée à 1 170 r, dans un ectoderme sain.*

L'aspect de ces explants diffère très peu de celui des explants de la série T2. On peut les cultiver aussi longtemps et ils réalisent une morphogenèse assez semblable : on retrouve les mêmes différenciations régionales en tête, tronc et queue, présence de balanciers, de nageoires et de chromatophores (figure 26, cliché 2). Nous avons fait l'examen histologique de 44 explants. On retrouve toujours des vestiges du greffon dans la cavité de l'explant. Il subsiste sous la forme d'un amas de plaquettes vitellines et de quelques noyaux nécrosés ou en voie de dégénérescence. Dans ces amas, il semble qu'il y ait parfois encore quelques noyaux sains. Néanmoins, le greffon paraît avoir perdu tout pouvoir d'autodifférenciation. Tous les explants examinés possèdent un *cerveau antérieur.* Dans 29 cas (66 %), les vésicules olfactives sont présentes. Elles vont par paires dans 12 de ces cas. Les yeux sont différenciés dans 33 cas (75 %) et pairs dans 15 de ces cas. Il y a des cristallins dans 10 cas (23 %). Dans 9 cas, il y a un cristallin unique et dans 1 cas seulement deux cristallins.

Le *cerveau postérieur* est bien représenté dans 40 cas (91 %) et accompagné d'otocystes dans 35 cas (80 %). Dans 16 de ces cas, les otocystes vont par paire. Il y a une *moelle* dans 40 cas (91 %), de la *chorde* dans 39 cas (89 %) et des *somites* dans 37 cas (84 %) (fig. 28, clichés 1 et 2).

d) *Série B : greffe d'une lèvre blastoporale dorsale irradiée à 30 000 r, dans un ectoderme sain.*

La morphologie de ces explants est très comparable à celle des précédents. Il y a toujours une région céphalique globuleuse avec des balanciers et une région tronco-caudale allongée avec des rudiments de nageoire. Il y a de nombreux chromatophores (fig 26, cliché 3). Cependant, les formations induites que l'on devine par transparence semblent considérablement réduites par rapport à celles des témoins. Nous avons fait un examen histologique détaillé de 27 explants.

Comme dans les explants de la série A, on retrouve des traces du greffon. Il n'est plus représenté que par un amas de plaquettes vitellines et par quelques noyaux nécrotiques. Les formations induites habituellement sont toutes présentes :

— *Le cerveau antérieur* est présent dans 25 cas (93 %), mais il n'est

Fig. 28. — Explant de la série A (greffe d'une lèvre blastoporale dorsale irradiée à 1 170 r dans un ectoderme sain). (Gr. : ×90.)

1. — Coupe histologique au niveau des formations céphaliques. A côté d'une petite masse archencéphalique, on voit un œil avec son cristallin *(C.)*.

2. — Coupe au niveau de la région antérieure du tronc. Belles formations deutérencéphaliques avec des otocystes *(ot.)*, qui voisinent avec des formations spinocaudales : moelle *(M.)*, chorde *(Ch.)* et somites *(S.)*.

accompagné de vésicules olfactives que dans 8 cas (30 %), dont 2 cas de formations paires. Il y a un œil, toujours unique, dans 11 cas (41 %) et un cristallin dans un seul cas (4 %).

— *Le cerveau postérieur* est présent dans 18 cas (67 %) et pourvu d'otocystes dans 15 cas (55 %). Ils vont par paire dans 12 de ces cas. La *moelle* est présente dans 24 cas (89 %), la *chorde* dans 16 cas (59 %) et les *somites* dans 20 cas (74 %).

Toutes ces formations sont très réduites au point de vue taille par rapport à celles des témoins (fig. 29, clichés 1 et 2).

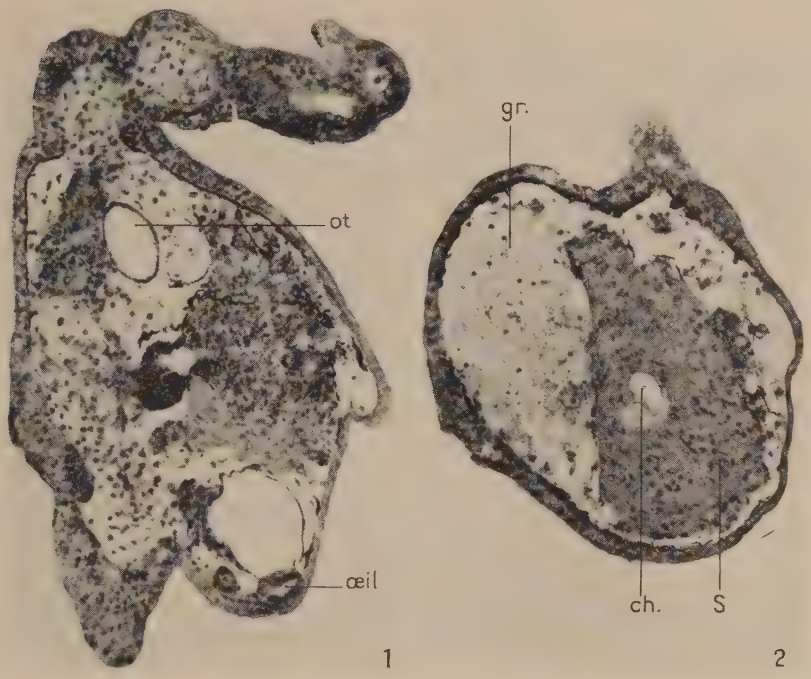

Fig. 29. — Explant de la série B (greffe d'une lèvre blastoporale dorsale irradiée à 30 000 r dans un ectoderme sain). (Gr. : ×80.)

1. — Coupe histologique au niveau des formations céphaliques : Archencéphale avec une vésicule oculaire, un otocyste *(ot.)*.

2. — Coupe au niveau du tronc : chorde *(Ch.)* et somites *(S.)*. A gauche, le greffon *(gr.)* en voie de nécrose La moelle n'est pas présente sur cette coupe.

e) *Série C : greffe d'une lèvre blastoporale dorsale irradiée à 150 000 r, dans un ectoderme sain.*

Les explants appartenant à cette série se différencient aussi rapidement que les autres et font une bonne morphogenèse : ils émettent des balanciers, possèdent des chromatophores et on distingue encore une région céphalique d'une région tronco-caudale pourvue de nageoires (fig. 26, cliché 4).

Cependant, on ne devine, par transparence, que peu de formations internes et l'ensemble paraît assez vésiculeux.

Ceci est confirmé par l'examen histologique de 15 explants.

Les formations *archencéphaliques*, quoique extrêmement réduites, sont présentes dans 14 cas (93 %). Il s'agit d'un petit nodule accompagné de vésicules olfactives dans 4 cas (27 %) et d'un œil toujours unique et réduit dans 5 cas (33 %).

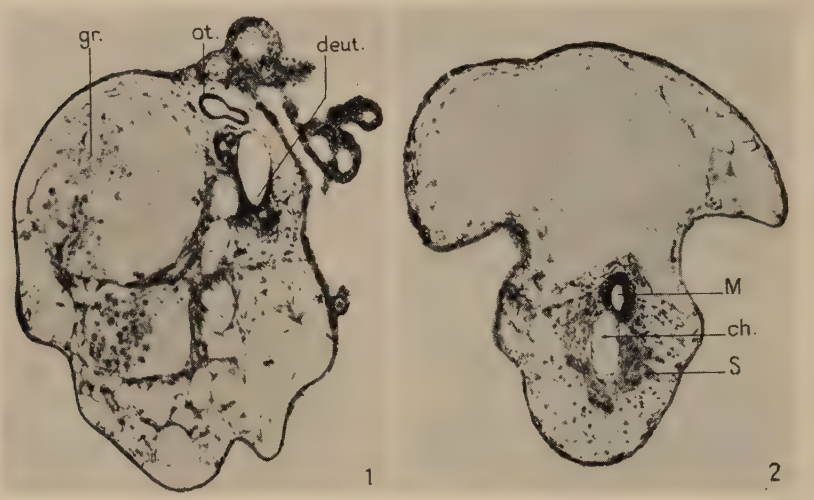

Fig. 30. — Explant de la série C (greffe d'une lèvre blastoporale dorsale irradiée à 150 000 r dans un ectoderme sain) (Gr. : ×45.)

1. — Coupe histologique au niveau des formations céphaliques : Deutérencéphale *(deut.)* avec 1 otocyste *(ot.)*. On voit le greffon *(Gr.)* nécrosé.

2. — Coupe au niveau de la queue. Moelle *(M.)*, chorde *(Ch.)*, somites *(S.)*.

Dans un seul cas, les vésicules olfactives étaient toutes les deux présentes et dans 1 cas également l'œil était pourvu d'un cristallin.

Les formations *deutérencéphaliques* sont présentes dans 10 cas (70 %) et accompagnées de vésicules auditives dans 6 cas (40 %) dont 1 cas de formations paires.

La *moelle* est présente dans 13 cas (87 %), la *chorde* dans 9 cas (60 %) et les *somites* dans 10 cas (70 %).

La moelle est toujours réduite, mais les somites et la chorde sont parfois assez bien développés (fig. 30, clichés 1 et 2).

Tous ces résultats sont groupés dans le tableau IV et schématisés par l'histogramme de la figure 31.

TABLEAU IV. — Formations induites dans un ectoderme compétent par des lèvres blastoporales irradiées aux rayons X (Méthode des « sandwichs ») = Séries A, B, C.

Séries témoins : T1 : culture d'ectoderme isolé;
T2 : greffe d'une lèvre blastoporale dorsale non irradiée.
(+ : formation unique; ++ : formation double ou triple).

	Série T1, 45 explants		Série T2, 44 explants		Série A (1 170 r), 44 explants		Série B (30 000 r), 27 explants		Série C (150 000 r), 15 explants	
	Nb	%	Nb	%	Nb	%	Nb	%	Nb	%
Archencéphale.	0	0	44	100	44	100	25	93	14	93
Vésicules olfactives.	0	0	38 { 18 + 20 ++	86	29 { 17 + 12 ++	66	8 { 6 + 2 ++	30	4 { 3 + 1 ++	27
Yeux.	0	0	42 { 22 + 20 ++	95	33 { 18 + 15 ++	75	11 { 11 +	41	5 { 5 +	33
Cristallins.	0	0	14 { 7 + 7 ++	32	10 { 9 + 1 ++	23	1 { 1 +	4	1 { 1 +	7
Deutérencéphale.	0	0	43	98	40	91	18	67	10	70
Vésicules auditives.	0	0	36 { 19 + 17 ++	82	35 { 19 + 16 ++	80	15 { 3 + 12 ++	55	6 { 5 + 1 ++	40
Moelle.	0	0	43	98	40	91	24	89	13	87
Chorde.	0	0	40	91	39	89	16	59	9	60
Somites.	0	0	40	91	37	84	20	74	10	70

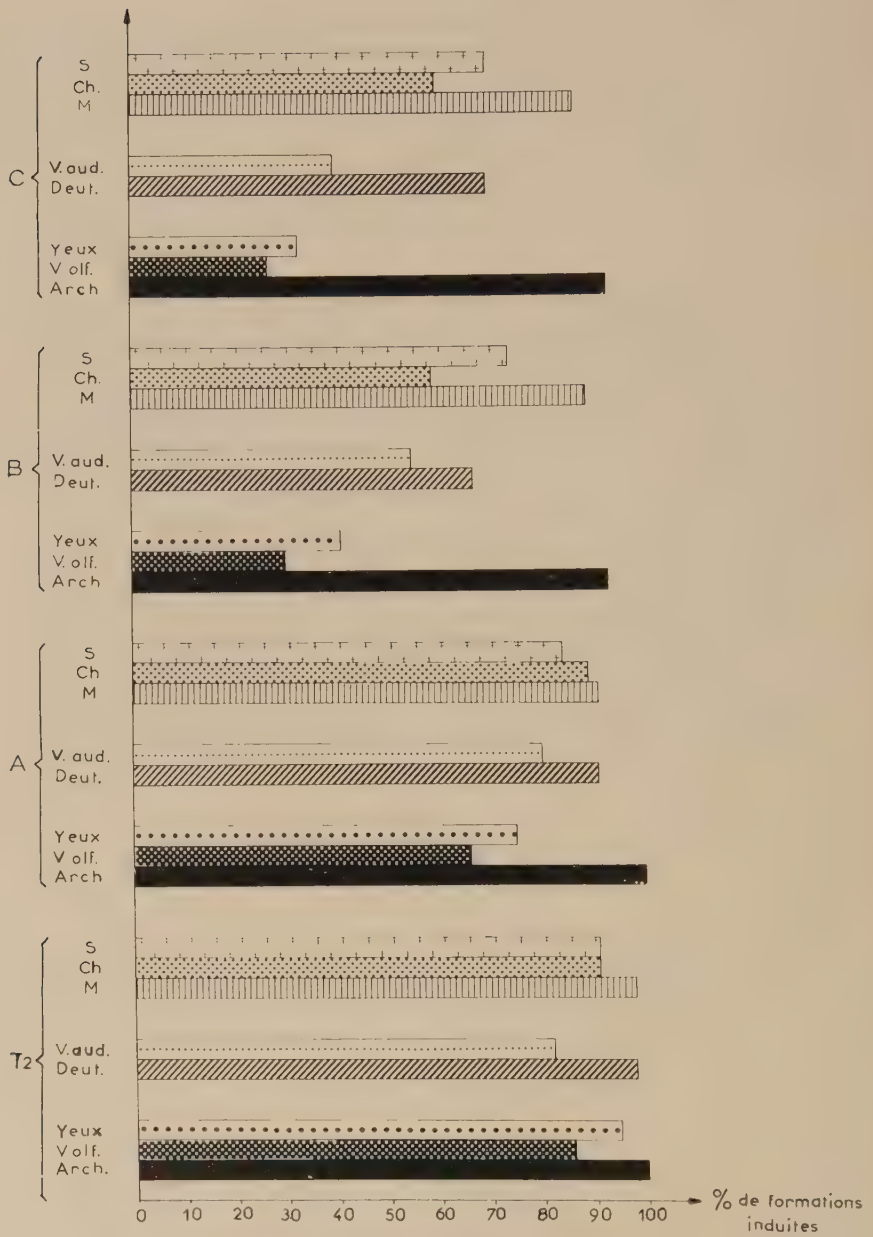

Fig. 31. — Pourcentage des formations induites dans un fragment d'ectoderme par une lèvre blastoporale dorsale :

1. Normale : T2.
2. Irradiée à 1 170 r : A.
3. Irradiée à 30 000 r : B.
4. Irradiée à 150 000 r : C.

Discussion

Tous nos efforts pour supprimer, à l'aide des rayons X, le pouvoir inducteur de la lèvre blastoporale dorsale sont donc restés vains. Après une irradiation de 1 170 r comme après une irradiation de 150 000 r, on peut obtenir toute la gamme des formations nerveuses ou mésodermiques. L'irradiation, aux rayons X, ne modifie donc en rien la régionalité du pouvoir inducteur du chordomésoderme.

Cependant, un effet quantitatif très net se manifeste, surtout après les plus fortes irradiations : la fréquence des inductions diminue sensiblement de même que le volume des formations induites.

— *Le cerveau antérieur,* toujours présent dans la série témoin T2 et dans la série A (1 170 r), manque dans 7 % des cas dans les séries B (30 000 r) et C (150 000 r).

— *Le cerveau postérieur,* présent dans 98 % des cas dans la série T2, manque dans 9 % des cas dans la série A, dans 33 % des cas dans la série B et dans 30 % des cas dans la série C.

— La *moelle* est également moins fréquente dans les séries A (91 %), B (89 %) et C (87 %) que dans la série T2 (98 %).

— La *chorde* et les *somites* sont présents dans 91 % des cas dans la série T2. La fréquence de la première diminue assez sensiblement dans les séries A (89 %), B (59 %) et C (60 %).

Les somites passent également de 84 % (série A) à 74 % (série B) et 70 % (série C).

On constate, de plus, une raréfaction des organes des sens associés aux différentes parties du cerveau :

— Les *vésicules olfactives,* bien différenciées dans 86 % des cas dans la série T2, n'existent que dans 66 %, 30 % et 27 % des cas dans les séries A, B et C. En outre, dans la série témoins, elles vont par paire dans 20 cas sur 38 (53 %), alors que dans les séries A, B et C ce n'est le cas que dans 12 cas sur 29 (42 %), 2 cas sur 8 (25 % et 1 cas sur 4 (25 %).

— Les yeux, normalement présents dans 95 % des cas (série T2), manquent dans 25 % des cas (série A), 59 % des cas (série B) et 67 % des cas (série C).

L'œil est unique dans 22 cas sur 42 dans la série T2 (52 %), dans 18 cas sur 33 dans la série A (55 %) et dans tous les cas dans les séries B et C.

Il y a induction de 2 cristallins (un par œil) dans 7 cas sur 14 dans la série T2 (50 %) et dans 1 cas sur 10 dans la série A (10 %). Il est toujours unique dans les séries B et C où il n'existe que dans 1 cas.

— Les *otocystes* sont présents dans 82 % des cas dans la série T2 (17 formations paires sur 36 : 47 %). Dans la série A, ils sont présents dans 80 % des cas (16 formations paires sur 35 : 46 %). Dans la série B, ils sont différenciés dans 55 % des cas (12 formations paires sur 15 :

80 %) et dans la série C dans 40 % des cas (1 formation paire sur 6 : 17 %) (voir tableau IV).

Cette diminution de fréquence affecte donc d'une façon à peu près égale toutes les formations induites. Elle se double d'une réduction importante du volume des structures différenciées. Nous n'avons pas fait d'étude quantitative mais les photographies des figures 27, 28, 29 et 30 permettent d'en avoir une idée.

Résumé et conclusions

Des irradiations, aux rayons X, de la lèvre blastoporale dorsale de jeunes gastrulas provoquent une diminution de fréquence et de volume des différentes formations induites.

Les doses de rayons X utilisées sont de 1 170, 30 000 et 150 000 r. La diminution du pouvoir inducteur est en rapport avec l'intensité de l'irradiation.

On retrouve dans les explants toute la gamme des différenciations qui existent chez les témoins : structures nerveuses céphaliques et spino-caudales et structures mésodermiques (chorde et somites).

L'irradiation ne modifie donc pas la qualité des inductions obtenues.

3° Expériences complémentaires

Les séries expérimentales qui précèdent soulèvent quelques problèmes annexes :

1° Que devient le greffon irradié ? Participe-t-il ou non à la formation des structures de l'explant ? Pour répondre à cette question, nous avons fait deux séries d'expériences :

a) Des cultures de lèvres blastoporales irradiées.

b) Des greffes de lèvres blastoporales de *Pleurodèle* dans de jeunes gastrulas de *Discoglosse* (greffes xénoplastiques).

2° Est-il possible qu'une partie des potentialités inductrices du greffon irradié provienne d'un effet cytolytique banal ?

Pour nous en assurer, nous avons réalisé des greffes de fragments d'ectoderme irradié dans un ectoderme sain.

a) Culture de lèvres blastoporales dorsales irradiées. — Depuis les expériences de greffes hétéroplastiques (Spemann et Mangold, 1924; Geinitz, 1925) et de sandwichs (Holtfreter, 1936), on sait que les tissus de l'hôte et ceux de la lèvre blastoporale transplantée s'unissent pour former un système aussi complet que possible : le transplant fournit toujours tout ou partie de la chorde et des somites, parfois une partie du système nerveux. Il induit l'hôte à compléter la chorde et les somites

et à fournir la majeure partie du système nerveux. Il se constitue une ébauche chimère. On sait également (Holtfreter, 1936) que des lèvres blastoporales cultivées *in vitro* sont capables de s'autodifférencier en ces mêmes structures.

Nous avons montré qu'après irradiation, le transplant conserve son pouvoir inducteur. Mais reste-t-il capable d'autodifférenciation ?

Nous avons cultivé des lèvres blastoporales dorsales, irradiées dans les conditions habituelles, et isolées dans du liquide de Holtfreter.

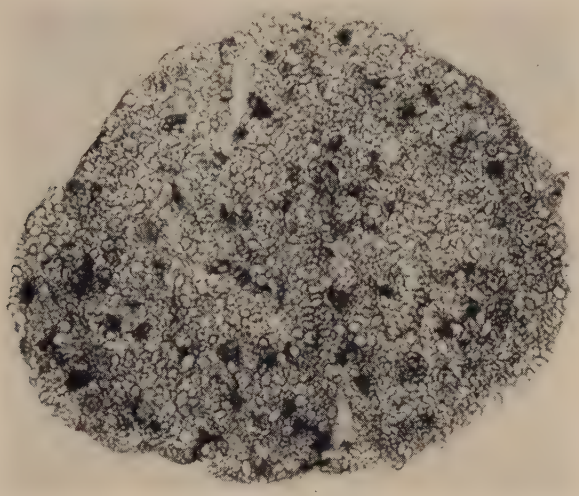

Fig. 32. — Culture de lèvre blastoporale dorsale, irradiée à 1 170 r. Coupe histologique : l'explant est incapable d'autodifférenciation. Il reste dense et inorganisé. (Gr. : ×175.)

— *Culture de lèvres blastoporales dorsales irradiées à 1 170 r.* — Nous avons réussi à les cultiver pendant deux semaines. Elles prennent, après quelques heures de culture, la forme de sphérules qui laissent échapper quelques cellules tout au long de la culture.

A l'histologie, on ne décèle aucun signe d'autodifférenciation. Il semble que des noyaux sains subsistent, mais en assez petit nombre (fig. 32).

— *Culture de lèvres blastoporales irradiées à 30 000 et 150 000 r.* — Après de telles irradiations, les explants s'arrondissent et tentent, comme précédemment, de former de petites sphères. Après quelques heures de culture, celles-ci se dissocient en cellules isolées qui sont vouées à la nécrose.

Tous les essais de cultures prolongées ont été infructueux. On peut conclure que des lèvres blastoporales dorsales isolées, ayant reçu des irradiations comprises entre 1 170 et 150 000 r sont incapables de s'autodifférencier en culture.

FIG. 33. — Greffe d'une lèvre blastoporale dorsale de Pleurodèle irradiée à 1 170 r, dans une gastrula de Discoglosse.

1. — Coupes histologiques au niveau de la région céphalique.

a) Le greffon *(Gr.)* a induit des structures archencéphaliques *(arch. 2)*. (Gr. : ×53.)

b) Détail de la coupe précédente. Le greffon *(Gr.)* possède des plaquettes

b) Greffes de lèvres blastoporales irradiées de Pleurodèle dans de jeunes gastrulas de Discoglosse. — Il aurait fallu, pour compléter les expériences de culture de lèvres blastoporales irradiées, faire des implantations xénoplastiques de lèvres blastoporales irradiées dans des fragments d'ectoderme sain. En choisissant deux types de Batraciens dont les cellules ont une pigmentation différente, nous aurions pu suivre exactement la destinée de chaque tissu. Malheureusement, faute de matériel, nous n'avons pu réaliser cette série expérimentale et sommes contrainte de rapporter ici le résultat de greffes xénoplastiques faites dans le cadre d'autres expériences (Et. Wolff et M. Reyss-Brion, 1957).

La technique utilisée est celle de Mangold et Spemann (1927). Elle consiste à implanter une lèvre blastoporale dans le blastocoele d'une jeune gastrula, par une fente pratiquée dans son toit (Einsteckmethode).

Les œufs de Discoglosses ont un développement très rapide. Nous les avons pris comme hôte et les avons fixés après 4 jours de culture. Ils sont alors au stade 23 de Gallien et Houillon (1951). Les greffons de lèvre blastoporale sont prélevés sur de jeunes gastrulas de Pleurodèle préalablement irradiées *in toto* pendant 1 mn 10 sec. à feu nu (1 170 r).

Nous avons fait un examen histologique de 8 embryons. Tous présentent des formations secondaires bien développées, sauf 2 chez lesquels les formations induites sont denses et peu différenciées. Chez les 6 autres, les structures formées sont les suivantes :

— *Archencéphale :* 6 cas positifs sur 6. Des vésicules olfactives sont présentes dans 3 cas et des yeux dans 5 cas.

— *Deutérencéphale :* 6 cas positifs sur 6. Il est accompagné d'otocystes dans 5 cas.

— *Moelle :* 4 cas positifs sur 6.

— *Chorde et somites :* 3 cas positifs.

On distingue facilement les cellules des deux espèces grâce à la pigmentation et à la grosseur des plaquettes vitellines. Avec la coloration de Damas, les plaquettes vitellines des cellules d'embryons de Discoglosse ont une teinte orangée. Celles des embryons de Pleurodèle prennent une coloration jaune pâle. De plus, les plaquettes vitellines de Discoglosse

---

vitellines beaucoup plus grosses que celles de l'hôte. On voit que les cellules des structures induites sont du type hôte. (Gr. : ×150.)

2. — Coupes histologiques du même embryon, au niveau du tronc.

a) Coupe au niveau du deutérencéphale de l'hôte *(deut. 1)*. A gauche, le greffon *(Gr.)* et les structures induites. Moelle *(M. 2)*, chorde *(Ch. 2)* et somites *(S. 2)*. (Gr. : ×38.)

b) Détail des structures induites. La moelle est recoupée en deux endroits. Toutes ces formations contiennent des granules vitellins du type hôte. (Gr. : ×112.)

sont très petites alors que celles de Pleurodèle sont beaucoup plus grosses (fig. 33, cliché 1 *a* et 1 *b*).

Dans tous les cas, les cellules des structures induites sont du type-hôte (fig. 33, clichés 1 *b* et 2 *b*). Le greffon semble donc toujours inutilisé, même lorsqu'il contient encore quelques cellules d'apparence saine.

Discussion. — Malgré leur insuffisance numérique, ces expériences sont intéressantes et confirment les précédentes. Dans tous les cas, il semble que les irradiations aient rendu le greffon incapable d'autodifférenciation. Les structures mésodermiques présentes dans ces explants ont donc été induites par le greffon et formées à partir de l'ectoderme. Ceci est vrai à plus forte raison pour les explants des séries expérimentales B et C dans lesquelles l'irradiation très intense du greffon rend impossible toute survie cellulaire. Or dans ces séries, on trouve également des formations de chorde et de somites souvent volumineuses (fig. 29, cliché 2 et fig. 30, clichés 1 et 2).

Nous nous sommes, d'autre part, demandé si la cytolyse du greffon peut intervenir pour stimuler l'ectoderme et si n'importe quel tissu irradié peut acquérir des propriétés inductrices. Nous avons réalisé la série expérimentale suivante :

c) Implantation de fragments d'ectoderme irradié dans un ectoderme sain. — On prélève de petits fragments de l'apex de la calotte ectodermique de jeunes gastrulas irradiées *in toto* (1 170 r). Ces fragments sont découpés à la taille des lèvres blastoporales greffées dans les expériences précédentes et introduits dans un fragment d'ectoderme normal suivant la technique utilisée précédemment (fig. 24). On cultive ces explants pendant 2 semaines. Ils se différencient peu pendant toute la culture. Leur aspect reste très voisin de celui des explants de la série T1 : ils ont une forme arrondie, quelquefois globuleuse et une surface granuleuse « en peau d'orange ».

Nous avons fait l'examen histologique de 28 explants.

Dans 24 cas, nous n'avons trouvé aucune différenciation dans les explants. Ils sont purement épidermiques et on ne trouve à l'intérieur que le greffon en voie de nécrose.

Dans 4 cas cependant (14 %), il existe quelques formations neuroïdes d'allure céphalique. Il s'agit de masses denses, peu différenciées ou d'un tube épaissi. Il n'y a jamais d'organes des sens ni de formations mésodermiques.

Ces structures sont donc peu caractéristiques. Ceci est en accord avec les observations qu'ont faites de nombreux auteurs sur les structures qui se différencient grâce à des actions cytolytiques (Barth et Graff, 1938; Barth, 1941; Holtfreter, 1944, 1945, 1947). On ne peut les confondre avec des structures différenciées après action d'un inducteur normal. En conclusion, on peut admettre l'éventualité d'un effet cyto-

lytique dû à l'irradiation du greffon, mais cet effet reste très faible. Il ne joue que dans un nombre restreint de cas et aboutit à la formation de structures nerveuses massives et mal différenciées. Il ne saurait être responsable des formations abondantes et harmonieuses observées dans les précédentes expériences.

Résumé

Nous avons procédé à des irradiations, aux rayons X, de lèvres blastoporales dorsales de jeunes gastrulas et les avons implantées dans un fragment d'ectoderme compétent (Méthode des « sandwichs »).

Les doses de rayons X administrées sont de 1 170, 30 000 et 150 000 r.

On constate que les inductions obtenues après implantation de lèvres blastoporales irradiées sont moins nombreuses et moins volumineuses que celles qui sont induites par des lèvres blastoporales normales.

Cependant, l'irradiation ne modifie pas la qualité des formations induites; elle affecte d'une manière égale les structures céphaliques et les structures spinocaudales.

On peut conclure qu'une forte irradiation aux rayons X provoque une diminution certaine du pouvoir inducteur de la lèvre blastoporale dorsale, mais ne modifie pas la régionalité des inductions obtenues. La chorde et les somites sont présents dans un grand nombre de cas, même après les plus fortes irradiations du territoire inducteur.

Des expériences de culture de lèvres blastoporales irradiées et de greffes xénoplastiques nous permettent de penser que le greffon irradié ne participe pas en tant que tissu à la formation de ces structures. L'irradiation supprime ses facultés d'autodifférenciation. Dans certaines expériences, nous avons remplacé la lèvre blastoporale dorsale irradiée par un fragment d'ectoderme irradié. Les inductions obtenues sont rares et mal différenciées.

La cytolyse provoquée par l'irradiation ne peut donc, à elle seule, être la source d'inductions cohérentes.

IV. — *DISCUSSION ET CONCLUSIONS*

Nous avons procédé à des irradiations totales ou localisées de l'œuf de Batraciens Urodèles, pour explorer le mécanisme de la détermination et de la différenciation des ébauches nerveuses, chordales et somitiques. De ces expériences, se dégagent les résultats suivants :

Au stade jeune gastrula, l'ébauche présomptive du système nerveux est très sensible à l'action des rayons X : une irradiation totale de l'œuf, de 1 170 r, provoque dans 95 % des cas la formation d'embryons dépour-

vus de système nerveux. Ce résultat permet d'étendre aux Urodèles les observations faites par R. Rugh (1954) sur des blastulas de *Rana catesbiana*.

Des expériences d'irradiations, localisées soit au territoire ectodermique compétent, soit au territoire chordo-mésodermique inducteur, nous ont permis d'expliquer ce résultat : l'absence de système nerveux est due aux lésions produites dans l'ectoderme. Les cellules ectodermiques irradiées sont incapables d'effectuer leur différenciation en cellules nerveuses. Les propriétés du territoire inducteur sont, par contre, peu modifiées par l'irradiation.

Il se pose un problème intéressant concernant l'altération de la compétence cellulaire par les rayons X. Pour l'aborder, nous avons procédé à des irradiations d'intensité croissante du territoire ectodermique. Nous avons observé une disparition progressive des différentes structures neurales qui suit toujours un ordre déterminé : les structures céphaliques disparaissent les premières, suivies d'assez loin par les structures spino-caudales. Parmi les structures céphaliques, les deutérencéphaliques sont particulièrement vulnérables. Ces résultats sont à rapprocher de ceux qu'ont obtenus les auteurs qui ont étudié le vieillissement de l'ectoderme ou son altération par diverses substances chimiques (voir historique). Dans tous les cas, les structures archencéphaliques sont celles qui disparaissent en premier lieu. Dans l'ectoderme vieilli ou altéré par des moyens physiques ou chimiques, il se produit donc des modifications qui aboutissent à la perte progressive de certaines capacités. Celles-ci sont indépendantes de l'action de l'inducteur qui, dans toutes ces expériences, reste constante.

Par quel mécanisme les rayons X peuvent-ils modifier la compétence cellulaire ?

Il y a peu de théories sur la nature de la compétence cellulaire. Gallera (1952) pense que la perte de la compétence provient de modifications de la perméabilité cellulaire. Le manque de réceptivité à une substance inductrice ne peut cependant être incriminé dans les expériences de Chuang (1955) qui observe la disparition de la compétence ectodermique dans des expériences de neuralisation sans inducteur. Il semble qu'il faille, avec ce dernier auteur et Nieuwkoop (1958), chercher sa cause dans des processus intrinsèques de la cellule. Leikola (1963) incrimine des modifications du noyau et du cytoplasme qui interviendraient avec le vieillissement. Nos propres expériences nous portent à soupçonner des modifications nucléaires plutôt que cytoplasmiques. En effet, nous avons obtenu des résultats avec des doses de rayons X assez faibles, compatibles avec la survie des cellules ectodermiques et même avec leur différenciation en épiderme. D'après les travaux de Vintemberger (1928-1929) et de Neyfakh (1964), ces doses seraient sans action sur le cytoplasme des cellules. Ceci n'est évidemment qu'une hypothèse,

mais nous nous proposons de vérifier dans des travaux ultérieurs si les doses de rayons X utilisées affectent réellement le métabolisme du noyau des cellules ectodermiques, en particulier en entreprenant une étude histochimique qualitative et quantitative des acides nucléiques dans la cellule ectodermique normale et irradiée.

En ce qui concerne l'action des rayons X sur le territoire chordo-mésodermique, les résultats obtenus reflètent une double action :

1° Une action sur les capacités d'autodifférenciation de ce territoire, qui se traduit par un arrêt parfois total de la morphogenèse.

2° Une action sur les propriétés inductrices de la lèvre blastoporale dorsale.

Cette action est uniquement quantitative et aboutit à une raréfaction en pourcentage et en volume des structures induites.

Contrairement à l'irradiation de l'ectoderme, l'irradiation du chordo-mésoderme ne modifie en rien la nature des inductions : on obtient la gamme habituelle des inductions nerveuses et mésodermiques.

Tout se passe comme si l'irradiation freinait la production de la substance inductrice mais ne modifiait pas sa qualité.

Si l'on admet que les rayons X n'altèrent pas les protéines, ces faits sont compatibles avec la théorie de la nature protéique des inducteurs.

RÉSUMÉ

1° De jeunes gastrulas de *Pleurodeles waltlii* ont été irradiées *in toto* en utilisant diverses doses de rayons X.

Avec un rayonnement d'une intensité de 1 170 r, on a obtenu des embryons qui sont totalement dépourvus de système nerveux dans 95 % des cas.

Des doses de rayons X plus élevées sont incompatibles avec la survie des embryons.

Afin de déterminer sur quelle ébauche agissent les rayons X, on a fait des irradiations localisées soit au territoire ectodermique réacteur, soit au territoire chordomésodermique inducteur. Dans le premier cas, la différenciation de l'ectoderme en formations nerveuses organisées ne se fait pas dans 86 % des cas et reste incomplète dans tous les autres. Dans le second cas, le pouvoir inducteur de la lèvre blastoporale dorsale est conservé dans 100 % des cas.

Au stade gastrula, les rayons X sont donc sans action sur l'inducteur mais ils altèrent les potentialités du territoire compétent.

2° Dans une autre série d'expériences, la calotte ectodermique de jeunes gastrulas *d'Ambystoma mexicanum* et de *Pleurodèles waltlii* a été soumise à des irradiations d'intensité croissante : 150 r, 300 r, 800 r et 1 050 r.

— Des irradiations de faible intensité (150 à 300 r) affectent la différenciation des formations cérébrales, mais n'agissent pas sur celle des structures spino-caudales.

— Des irradiations d'intensité moyenne (550 à 800 r) altèrent considérablement les formations archencéphaliques et surtout deutérencéphaliques. Les formations spinocaudales sont encore présentes dans 100 % des cas.

— Une irradiation de 1 050 r supprime totalement les formations céphaliques. La moelle continue à se différencier dans 50 % des cas chez le Pleurodèle et dans 25 % des cas chez l'Axolotl. La perte de la compétence des cellules ectodermiques irradiées vis-à-vis des inducteurs se fait suivant un ordre déterminé qui est le même pour les œufs de Pleurodèle et ceux d'Axolotl : les structures deutérencéphaliques et archencéphaliques disparaissent les premières. La moelle peut encore se différencier après d'assez fortes irradiations.

— Des irradiations totales de l'œuf donnent des résultats parallèles.

On a d'autre part réalisé des expériences de parabioses entre animaux sains et animaux irradiés : on peut ainsi prolonger la survie des sujets irradiés.

Les animaux irradiés et mis en parabiose sont capables de reconstituer en partie leurs formations nerveuses. Cependant, on retrouve la même incapacité des cellules ectodermiques à donner des formations cérébrales : après une irradiation de 1 050 r, elles sont incapables de se différencier en cerveau, alors qu'elles peuvent encore donner de la moelle dans 100 % des cas.

3° On a étudié les potentialités du territoire inducteur chordomésodermique après irradiation aux rayons X.

a) On a greffé, en « sandwich », dans un fragment d'ectoderme compétent, des lèvres blastoporales dorsales irradiées à 1 170, 30 000 et 150 000 r.

Même après les plus fortes irradiations, la lèvre blastoporale reste capable d'induire les différentes structures neurales ou mésodermiques que l'on trouve chez les témoins.

Cependant, on note, après irradiation, une diminution de la fréquence et du volume des formations induites.

On en a conclu que l'irradiation ne modifie pas la nature de l'inducteur, mais freine sa production.

b) Des cultures de lèvres blastoporales dorsales irradiées à 1 170, 30 000 et 150 000 r ont été réalisées. Les explants sont incapables d'autodifférenciation. Dans les deux dernières séries, ils se nécrosent rapidement.

c) Des greffes de lèvres blastoporales irradiées de Pleurodèle dans de jeunes gastrulas de Discoglosse montrent également qu'après irradiation, il n'y a pas autodifférenciation de la lèvre blastoporale dorsale. Les structures secondaires sont du type hôte.

d) Des fragments d'ectoderme irradié ont été greffés dans un ectoderme sain afin de déterminer si un tissu quelconque irradié peut devenir inducteur. Dans un nombre restreint de cas, il se forme quelques structures neuroïdes, mais on n'a jamais obtenu de formations cohérentes.

Ces expériences permettent d'écarter l'hypothèse d'une participation du greffon irradié, en tant que tissu ou en tant qu'agent cytolytique, à la formation des structures de l'explant. Celles-ci sont toutes dues à l'action inductrice de la lèvre blastoporale dorsale, et des irradiations, même intenses, n'en modifient pas la qualité.

SUMMARY

1° Young gastrulas of Pleurodeles Waltlii were irradiated in toto with various doses of X rays.

After a dose of 1 170 r, the embryos were deprived of a nervous system in 95 % of the cases. Higher X rays doses do not allow survival of the embryos.

In order to find which anlage are affected by X rays, local irradiations were done, either on the reacting ectodermal field either on the inductive chordo-

mesodermal field. In the first instance, differentiation of the ectoderm into nervous organs is inhibited in 86 % of the cases and remains incomplete in the others. In the second instance, the inductive potentialities of the dorsal blastoporal lip is active in 100 % of the cases.

These results indicate that at the gastrula stage, X rays are without effect on the inductor, but they change the potentialities of the competent field.

2° In another series of experiments, the ectodermal cap of young gastrulae from Ambystoma mexicanum and from Pleurodeles Waltlii was irradiated with increasing doses : 150 r, 300 r, 800 r and 1 050 r. Low intensity irradiations (150 to 300 r) alter the differenciation of the brain but have no influence on the differenciation of the spino-caudal formations. Medium intensity irradiations (550 to 800 r) widely modify archencephalic formations and alter deuterencephalic ones even more. However spinocaudal formations are developed in 100 % of the cases.

3° An 1 050 r irradiation, completly inhibits cephalic formations. The spinal cord develops in 50 % of the cases in Pleurodeles and in 25 % of the cases in Axolotl. The loss of irradiated ectodermal cells competence toward inductors, occurs according to a determined sequence which is the same for the eggs of Pleurodeles and of Axolotl : the deuterencephalic and archencephalic structures are the first to disappear. The spinal cord is still able to differentiate after rather high irradiations.

Irradiations of the whole egg give similar results.

On the other hand, parabiosis between normal and irradiated animals were performed, thus allowing longer survival of the irradiated animals. The irradiated animals associated with healthy ones are able to form again partially their nervous structures. However, the ectodermal cells are still unable to differentiate into cerebral structures : after an irradiation of 1 050 r, they are unable to differentiate into brain whereas they still form a spinal cord in 100 % of the cases.

4° Potentialities of the chordomesodermal inductive field were studied after an X ray irradiation.

a) Dorsal blastoporal lips irradiated with 1 170, 30 000 and 150 000 r, were grafted sandwich-like, in a fragment of normal competent ectoderm.

Even after the highest irradiations the blastoporal lip is able to induce the different neural or mesodermal structures found in controls.

However, a diminution of frequency and size of the induced formations is observed after irradiation.

It is concluded that irradiation does not midify the nature of the inductor but diminishes its inducing power.

b) Dorsal blastoporal lips irradiated at 1 170, 30 000 and 150 000 r were cultured. The explants are unable to undergo sel differentiation. In the last two series, they quickly undergo necrosis.

c) Grafts of irradiated blastoporal lips of Pleurodeles into young Discoglossus gastrulae also prove that after irradiation there is no selfdifferenciation of the dorsal blastoporal lip. The secondary structures which develop belong to the Discoglossus type.

d) Fragments of irradiated ectoderm were grafted in an unirradiated ectoderm in order to see if any kind of irradiated tissue may become an inductor. In a few cases, some neuroïd structures develop but coherent formations are never obtained.

These experiments show that a participation of the irradiated graft, either as a tissue, or as cytolytic agent, in the differentiation of the explant can be excluted. The structures in the explant are all evoked by the inductive action of the dorsal blastoporal lip; and even strong irradiations do not alter its quality.

BIBLIOGRAPHIE

Barth (L. G.), 1941. — Neural differentiation without organizer. *J. exp. Zool.*, **87**, 371-384.

Barth (L. G.) et Graff (S.), 1938. — The chemical nature of the amphibian organizer. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **6**, 385-391.

Bautzmann (H.), Holtfreter (J.), Spemann (H.) et Mangold (O.), 1932. — Versuche zur Analyse der Induktionsmittel in der Embryonalentwicklung. *Naturwiss.* **20**, 971-974.

Brachet (J.) et Denis (H.), 1963. — Effects of actinomycin D on morphogenesis. *Nature*, **198**, 205-206.

Burns (R. K.), 1925. — The sex of parabiotic troins in Amphibia. *J. exp. Zool.*, **42**, 31-90.

Chuang (H. H.), 1940. — Weitere Versuche über die Veränderung der Induktionsleistungen von gekochten Organteilen. *Arch. Entw.-Mech. Org.*, **140**, 25-38.

— 1955. — Untersuchungen über die Reaktionsfähigkeit des Ektoderms mittels sublethaler Cytolyse. *J. Acad. Sinica*, **4**, 151-186.

Damas (H.), 1945. — La coloration des tissus chargés de vitellus. *Arch. Biol.*, **56**, 395-404.

Engländer (H.) et Johnen (A. G.), 1957. — Experimentelle Beiträge zu einer Analyse der spezifischen Induktionsleistung heterogener Induktoren. *J. Embryol. exp. Morph.*, **5**, 1-31.

Gallera (J.), 1952. — Inductions céphaliques dans l'ectoblaste vieillissant *(Triturus alpestris)*. *Arch. Entw.-Mech. Org.*, **146**, 21-67.

— 1953. — L'action de l'urée sur les compétences cérébrogènes et sensorielles de l'ectoblaste. *Rev. Suisse Zool.*, **60**, 547-566.

Gallera (J.) et Baud (C. A.), 1954. — Etude ultrastructurale de l'ectoblaste chez l'embryon d'Urodèle normal ou traité par l'urée. *J. Embryol. exp. Morph.*, **2**, 106-113.

Gallien (L.), 1948. — Sur les caractères et l'intérêt biologique d'un Batracien Anoure de Tunisie : *Discoglossus pictus* Otth. *Bull. Soc Sc. nat. Tunisie*, **1**, 80-82.

— 1952. — Elevage et comportement du Pleurodèle au laboratoire. *Bull. Soc. Zool. France*, **77**, 456-461.

— 1957. — Parabiose de larves tératologiques chez le Triton : Pleurodèles waltlii Michah. *C. R. Soc. Biol.*, **151**, 1085-1087.

— 1958. — Problèmes et concepts de l'embryologie expérimentale. Gallimard, édit., Paris.

Gallien (L.) et Durocher (M.), 1957. — Table chronologique du développement chez Pleurodèles waltlii Michah. *Bull. Biol. Fr. Belg.*, **91**, 97-114.

Gallien (L.) et Houillon (Ch.), 1951. — Table chronologique du développement chez *Discoglossus pictus*. *Bull. Biol.Fr. Belg.*, **85**, 373-375.

Geinitz (B.), 1925. — Embryonale Transplantation zwischen Urodelen und Anuren. *Arch. Entw. Mech. Org.*, **106**, 357-408.

Hayashi (Y.), 1958. — The effects of pepsin and trypsin on the inductive ability of pentose nucleoprotein from guinea pig liver. *Embryologia*, **4**, 33-53.

— 1959 *a*. — The effect of ribonuclease on the inductive ability of liver pentose nucleoprotein. *Developt. Biol.*, **1**, 247-268.

— 1959 *b*. — The effect of pepsin on the regional inductive ability of pentose nucleoprotein from the kidney. *Embryologia*, **4**, 327-335.

Holtfreter (J.), 1933 *a*. — Eigenschaften und Verbreitung induzierender Stoffe. *Naturwiss.*, **21**, 766-770.

— 1933 *b*. — Nachweis der Induktionsfühigkeit abgetäteter Keimteile. Isolations-und Transplantations versuche. *Arch. Entw.-Mech. Org.*, **128**, 584-633.
— 1936. — Regionale induktionen in xenoplastisch zusammengesetzten explantaten. *Arch. Entw.-Mech. Org.*, **134**, 466-550.
— 1938. — Veränderungen der Reaktionsweise im alternden isolierten gastrulaektoderm. *Arch. Entw.-Mech. Org.*, **138**, 163-196.
— 1944. — Neural differentiation of ectoderm through exposure to saline solution. *J. exp. Zool.*, **95**, 307-340.
— 1945. — Neuralization and epidermization of gastrula ectoderm. *J. exp. Zool.*, **98**, 161-209.
— 1947. — Neural induction in explants which have passed through a sublethal cytolysis. *J. exp. Zool.*, **106**, 197-222.
Holtfreter (J.) et Hamburger (V.), 1955. — Embryogenesis : Progressive differentiation. Amphibians. *In :* Analysis of Development. Ed. by B. H. Willier, P. A. Weiss et V. Hamburger. Saunders, Philadelphia and London, 230-296.
Hori (R.) et Nieuwkoop (P. D.), 1955. — Induction phenomena with denatured inductor. *KKl. Nederl. Akad. Wetensch., Proc., Sie C.*, **58**, 266-272.
Kirrmann (J. M.), 1962. — Expériences de radioprotection et de radiosensibilisation sur des organes embryonnaires du Poulet. *Bull. Biol. Fr. Belg.*, **96**, 365-463.
Kuusi (T.), 1951. — Ueber die chemische Natur der Induktions staffe mit besonderer Berücksichtigung der Rolle der Proteine und Nukleinsäuren. *Ann. Zool. Soc. « Vanamo »*, **14**, 1-98.
Lehmann (F. E.), 1929. — Die Entwicklung des Anlagen-musters im Ektoderm der Tritongastrula. *Arch. Entw.-Mech. Org.*, **117**, 312-383.
Leikola (A.), 1963. — The mesodermal and neural competence of isolated gastrula ectoderm studied by heterogenous inductors. *Ann. Zool. Soc. « Vanamo »*, **25**, 1-50.
Lutz (H.), Bonhomme (Ch.) et Lutz-Ostertac (Y.), 1955 *a*. — Action des ultrasons sur le blastoderme non incubé d'oiseau. *C. R. Acad. Sc.*, **240**, 1931-1932.
— 1955 *b*. — Action localisée des ultra-sons sur le blastoderme non incubé de l'œuf d'oiseau. *C. R. Soc. Biol.*, **149**, 1475-1477.
Machemer (H.), 1932. — Experimentelle Untersuchung über die Induktionsleistungen der oberen Urmundlippe in älteren Urodelenkeimen. *Arch. Entw.-Mech. Org.*, **126**, 391-456.
Mangold (O.), 1929. — Experimente zur Analyse der Determination und Induktion der Medullarplatte. *Arch. Entw.-Mech. Org.*, **117**, 586-696.
Mangold (O.) et Spemann (H.), 1927. — Ueber Induktion von Medullarplatte durch Medullarplatte im jüngeren Keim, ein Beispiel homoögenetischer oder assimilatorischer Induktion. *Arch. Entw.-Mech. Org.*, **111**, 341-422.
Masui (Y.), 1956. — Effect of LiCl upon the organizer and the presumptive ectoderme. *Annot. Zool. Japon.*, **29**, 75-78.
— 1959. — Induction of neural structure under the influence of Lithium Chloride. *Annot. Zool. Japon.*, **32**, 23-30.
— 1960 *a*. — Differentiation of the prechordal tissue under influence of Lithium Chloride. *Mem. Könan Univ. Sci.*, **4**, 65-78.
— 1960 *b*. — Alteration of the differentiation of gastrula ectoderm under influence of Lithium Chloride. *Mem. Könan Univ. Sci.*, **4**, 79-102.
— 1960 *c*. — Effect of Lithium Chloride upon differentiation of the neural-plate ectoderm of head area. *Mem. Könan Univ. Sci.*, **4**, 103-115.
— 1961. — Mesodermal and endodermal differentiation of the presumptive ectoderm of Triturus gastrula through influence of lithium ion. *Experientia*, **17**, 458-459.
Neyfakh (A. A.), 1964. — Radiation investigation of nucleo-cytoplasmic interrelations in morphogenesis and biochemical differentiation. *Nature*, **201**, 880-884.
Nieuwkoop (P. D.), 1950. — Neural competence and neural fields. *Rev. suisse Zool.*, **57**, 23-40.
— 1958. — Neural competence of the gastrula ectoderm in Amblystoma mexicanum. An attempt at quantitative analysis of morphogenesis. *Acta Embryol Morph. exp.*, **2**, 13-53.

— 1960. — The neural competence of the ectoderme in amphibians. *Arch. Neerl. Zool.*, **13**, 588-590.

Ogi (K.), 1961. — Vegetalisation of the presumptive ectoderm of the Triturus-gastrula by exposure to lithium chloride solution. *Embryologia*, **5**, 384-396.

Pasteels (J.), 1942. — New observations concerning the map of presumptive areas of the young amphibian gastrula (Amblystoma et Discoglossus). *J. exp. Zool.*, **89**, 255-281.

Peterfi (T.), 1921. — Eine beschleunigte Celloïdin — Paraffin — Einbettung mit Nelkenöloder methylbenzoat celloïdin. *Ztschr. f. wiss. Mikr.*, **38**, 342-345.

Raunich (L.), 1942. — Die Reaktionsleistung des verschieden alten Gastrulaektoderms von Urodelen — und Anurenkiemen auf aspezifische Induktoren. *Naturwiss.*, **30**, 709-711.

Reyss-Brion (M.), 1962. — Modifications de la compétence de l'ectoderme de gastrula de Batracien après irradiation aux rayons X. *C. R. Acad. Sc.*, **255**, 1013-1014.

— 1963. — Sur les structures différenciées par l'ectoderme de Batracien après irradiation aux rayons X. *J. Embryol. exp. Morph.*, **11**, 649-657.

Rollhauser Ter Horst (J.), 1953. — Die Induktionsleistung verschiedener Tritonkeiteile nach denaturierung. *Arch. f. Entw.-Mech. Org.*, **146**, 183-200.

Rugh (R.), 1954. — The effect of ionizing radiations on amphibian development. *J. Cell. and Comp. Physiol.*, **43**, 39-76.

Sala (M.), 1956. — The character of the « local activations » formed in sandwich explants of competent ectoderm containing neural formations induced by different cranio-caudal portions of the archenteron roof. *Proc. Kon. Ned. Akad. Wet.*, **59**, 661-667.

Saxén (L.) et Toivonen (S.), 1962. — Primary embryonic induction. J. W. Arrowsmith Lt. d., Bristol.

Schechtman (A. M.), 1938. — Competence for neural plate formation in Hyla regilla and the so-called nervous layer of the ectoderm. *Proc. Soc. exp. Biol.*, **38**, 430-433.

Spemann (H.), 1921. — Ueber die Erzeugung tierischer chimaeren durch heteroplastische embryon ale Transplantation zwischen Triton taeniatus und T. cristatus. *Arch. Entw.-Mech. Org.*, **48**, 533-570.

— 1927. — Neue Arbeiten über Organisatoren in der tierischen Entwicklung. *Naturwiss.*, **15**, 946-951.

— 1931 *a*. — Ueber den Anteil von Implantat und Wirtskeim an der Orientierung und Beschaffenheit der induzierten Embryonalanlage. *Arch. Entw.-Mech. Org.*, **123**, 389-517.

— 1931 *b*. — Das verhalten von Organisatoren nach Zerstören ihrer Struktur. *Verh. Deutsch. Zool. Ges.*, **34**, 129.

Spemann (H.) et Mangold (H.), 1924. — Ueber Induktion von Embryonalanlagen durch Implantation artfremder Organisatoren. *Arch. Entw.-Mech. Org.*, **100**, 599-638.

Tiedemann (H.) et Tiedemann (H.), 1959. — Versuche zur Gewinnung eines mesodermalen Induktionsstoffes aus Hühnerembryonen. *Hoppe-Sey-Zeitschr.*, **314**, 156-176.

Toivonen (S.), 1954. — The inducing action of the bone-marrow of the guinea-pig after alcohol and heat treatment in implantation and explantation experiments with embryos of Triturus. *J. Embryol. exp. Morph.*, **2**, 239-244.

Toivonen (S.), Kohonen (J.), Saukkonen (J.), Saxén (L.) et Vainio (T.), 1961. — Preliminary observations of the inhibition of neural induction by S-fluorouracil. *Embryologia*, **6**, 177-184.

Vahs (W.), 1957. — Experimentelle Untersuchungen am Triturus-Keim über die stofflichen Mittel abnormer Induktoren. *Arch. Entw.-Mech. Org.*, **149**, 339-364.

Vintemberger (P.), 1928. — Sur les effets d'applications de rayons X localisées soit au protoplasme, soit à la région nucléaire de la cellule. *C. R. Soc. Biol.*, **99**, 1968-1971.

— 1929. — Sur les résultats de l'application d'une très forte dose de rayons X à diverses régions de l'œuf de grenouille rousse. *C. R. Soc. Biol.*, **102**, 1055-1057.

Vogt (W.), 1929. — Gestaltungsanalyse am Amphibienkeim mit örtlicher Vitalfärbung. II. Gastrulation und Mesodermbildung bei Urodelen und Anuren. *Arch. Entw.-Mech. Org.*, **120**, 384-706.

Waddington (C. H.), 1932. — Experiments on the development of chick and duck embryos cultivated *in vitro*. *Phil. Trans. Royal Soc. London*, **221**, 179-230.

Wolff (Et.), 1936. — Les bases de la tératogénèse expérimentale des Vertébrés amniotes d'après les résultats de méthodes directes. *Arch. Anat. Hist. et Embryol.*, **22**, 1-382.

Wolff (Et.) et Reyss-Brion (M.), 1957. — L'effet des rayons X sur la gastrula d'un Batracien urodèle : Pleurodèles waltlii. *C. R. Acad. Sc.*, **244**, 3172-3175.

Yamada (T.), 1959. — A progressive change in regional inductive effects of the bone marrow caused by heat-treatment. *Embryologia*, **4**, 175-190.

— 1962. — The inductive phenomenon as a tool for understanding the basic mechanism of differentiation. *J. Cell. et Comp. Physiol.*, **60**, suppl. 1, 49-64.

Yamada (T.) et Takata (K.), 1961. — A technique for testing macromolecular samples in solution for morphogenetic effects on the isolated ectoderm of the amphibian gastrula. *Developmental Biol.*, **3**, 411-423.

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté :

LA TOLÉRANCE IMMUNOLOGIQUE ACQUISE PENDANT LA VIE EMBRYONNAIRE

Vu et approuvé :
Paris, le 24 octobre 1964.

Le Doyen
de la Faculté des Sciences,
Marc Zamansky.

Vu et permis d'imprimer :
Le Recteur
de l'Académie de Paris,
Jean Roche.

Printed in France.